

Aus der
Klinik für Neurologie
Direktor: Prof. Dr. W. H. Oertel
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Prä- und postprandiale Ghrelinsekretion
bei Patienten mit Parkinson Erkrankung,
REM-Schlaf-Verhaltensstörung und
Multipler Sklerose**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt

von
Daniel Thomi
aus Friedberg

Marburg, 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
26.06.2013

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wolfgang Oertel

1. Korreferent: Prof. Dr. med. Ulrich Koehler

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ghrelin	1
1.1.1	Struktur und Rezeptor	1
1.1.2	Synthese und Funktionen	2
1.2	Das idiopathische Parkinsonsyndrom	3
1.2.1	Definition und Einteilung	3
1.2.2	Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese	3
1.2.3	Klinik und Diagnose	4
1.2.4	Therapie	5
1.2.5	Modell nach Braak und aktuelle Erkenntnisse	5
1.2.6	Die prämotorische Phase	8
1.3	REM-Schlaf-Verhaltensstörung	9
1.3.1	Definition und Einteilung	9
1.3.2	Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese	9
1.3.3	Klinik und Diagnose	10
1.3.4	Therapie	10
1.4	Multiple Sklerose	10
1.4.1	Definition und Einteilung	10
1.4.2	Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese	11
1.4.3	Klinik und Diagnose	11
1.4.4	Therapie	11
1.5	Ghrelin und die untersuchten Erkrankungsbilder	12
1.5.1	RBD / IPS und Ghrelin	12
1.5.2	Multiple Sklerose und Ghrelin	12
1.6	Ziel der Arbeit	13
2	Probanden und Methoden	14
2.1	Probandenkollektiv	14
2.1.1	Ein- und Ausschlusskriterien	15
2.2	Versuchsdurchführung	16
2.2.1	Fragebögen	18
2.2.2	Geräte- und Materialliste	20
2.3	Zielgrößen und statistische Auswertung	20

3	Ergebnisse.....	22
3.1	Probandenkollektiv	22
3.2	Ghrelinkonzentrationen der Auswertungsparameter	24
3.3	Ghrelinkonzentrationen zusätzlicher Parameter	32
4	Diskussion	37
4.1	Diskussion der Methodik und des Probandenkollektivs.....	37
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	41
4.3	Schlussfolgerung	45
4.4	Bedeutung für zukünftige Forschungsprojekte.....	47
5	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	49
6	Literaturverzeichnis	50
7	Zusammenfassungen	58
8	Anhang	60
8.1	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	60
8.2	Danksagung	61

Abkürzungsverzeichnis

AG	: acetyliertes Ghrelin (englisch: acyl-ghrelin)
AUC	: area under the curve (deutsch: Fläche unter der Kurve)
BDI-II	: Beck Depression Inventory II
BMI	: body mass index
CCK	: Cholecystokinin
DAG	: desacetyliertes Ghrelin (englisch: desacyl-ghrelin)
dmNV	: dorsal motorischer Kern des Nervus vagus
ELISA	: enzyme linked immunosorbent assay
G	: Erdbeschleunigung
GABA	: γ -Aminobuttersäure
GH	: growth hormone (deutsch: Wachstumshormon)
GIP	: Glukoseabhängige insulinotrope Peptid
GRLN-R	: ghrelin receptor (deutsch: Ghrelinrezeptor)
GOAT	: Ghrelin-O-Acyl-Transferase
h	: hour (deutsch: Stunde)
H&Y	: Hoehn und Yahr
IFG-1	: insulin-like growth factor 1 (deutsch: insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1)
IPS	: idiopathisches Parkinsonsyndrom
iRBD	: idiopathic REM sleep behaviour disorder (deutsch: idiopathische REM-Schlaf-Verhaltensstörung)
kcal	: Kilokalorie
KIS	: klinisch isoliertes Syndrom
ml	: Milliliter
μ l	: Mikroliter
MMST	: Mini-Mental-Status-Test
MPP+	: 1-Methyl-4-phenyl-pyridin
MS	: Multiple Sklerose (englisch: multiple sclerosis)
n	: Anzahl
N	: Normalität. Synonym: Äquivalentkonzentration
NF- κ B	: nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
N. vagus	: Nervus vagus
PANDA	: Parkinson Neuropsychometric Dementia Assessment
PD	: Parkinson's disease (deutsch: idiopathisches Parkinsonsyndrom)
PHMB	: p-Hydroxymercuribenzoic acid
pg	: Picogramm

PP	: pankreatisches Polypeptid
RBD	: REM sleep behaviour disorder (deutsch: REM-Schlaf-Verhaltensstörung)
RBDSQ	: REM sleep behavior disorder screening questionnaire
RIA	: Radioimmunassay
SNpc	: Substantia nigra pars compacta
SP-MS	: sekundär-progrediente Multiple Sklerose
SR-MS	: schubförmig-remittierende Multiple Sklerose
UPDRS	: Unified parkinson disease rating scale
ZNS	: zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Das Wissen um die Wirkungs- und Steuerungsfunktionen von Hormonen im Körperhaushalt bildet ein dynamisch wachsendes Feld seit ihrer Entdeckung Anfang des 20. Jahrhunderts. Mit ihnen wuchs das Verständnis der physiologischen Körperfunktionen, die Möglichkeiten Erkrankungen frühzeitig zu erkennen und diese adäquat zu therapieren. Vorreitermodell war das Hormon Insulin im Zusammenhang mit der Zuckererkrankung Diabetes mellitus (Macleod 1922).

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag leisten, die Bedeutung des Hormons Ghrelin bei drei ausgewählten Erkrankungsbildern und diesbezüglich weitere Forschungsmöglichkeiten darzustellen.

In der Einleitung wird zunächst das Hormon Ghrelin vorgestellt. Es folgt eine Beschreibung der untersuchten Erkrankungsbilder, um schließlich den direkten Bezug zwischen Hormon und Erkrankung zu erläutern. Anschließend werden Probanden, angewandte Methoden und die Ergebnisse beschrieben. Diese werden abschließend im letzten Kapitel diskutiert.

1.1 Ghrelin

1.1.1 Struktur und Rezeptor

Bei der Suche nach dem endogenen Agonisten zur Wachstumshormonfreisetzung entdeckten Kojima und Kollegen 1999 das Hormon Ghrelin im Magen der Ratte (Kojima et al. 1999). Ghrelin wird in neuroendokrinen Zellen synthetisiert, die sich im ganzen Magendarmtrakt mit einer nach aboral abnehmenden Häufigkeit nachweisen lassen. Hauptproduktionsort ist der Magenfundus. Minimale Mengen lassen sich auch in anderen Organen, wie Pankreas und Hypothalamus, nachweisen (Kojima et al. 1999; Date et al. 2000; Sato et al. 2011).

Das Ghrelin-Gen kodiert für drei Hauptprodukte: desacetyliertes Ghrelin (DAG), acetyliertes Ghrelin (AG) und Obestatin. Auf Letzteres und alternative Splicevarianten wird in dieser Arbeit nicht näher eingegangen, da nur DAG und AG untersucht wurden. Das quantitativ häufigere DAG kann durch das am endoplasmatischen Retikulum befindliche Enzym Ghrelin-O-Acyl-Transferase (GOAT) mit einer Oktansäure zu AG verestert werden. Beide Formen haben eine Länge von 28 Aminosäuren. Es gibt bislang keine international vergleichbaren Normwerte, aber in den meisten wissenschaftlichen Arbeiten beträgt die Gesamtkonzentration zwischen 150–600 pg/ml und das AG:DAG-Verhältnis 1:5 bis 1:20 (Kosowicz 2011; Sato et al. 2011).

Die Oktansäure des AG ist essentiell für die Bindung an den Ghrelin-Rezeptor. Initial als „growth hormone secretagogue receptor 1a“ deklariert, wurde er nach international pharmakologischen Richtlinien in „ghrelin receptor“ (GRLN-R) umbenannt (Davenport 2005). Es handelt sich um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der bei Aktivierung einen Calciumausstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum bewirkt. GRLN-R lassen sich in zahlreichen Organen (z.B. Hypophyse, Pankreas etc.) nachweisen (Korbonits et al. 2004). Für diese Arbeit von besonderem Interesse ist der Nachweis des GRLN-R in der Substantia nigra pars compacta (SNpc) und dem dorsal motorischen Kern des Nervus vagus (dmNV) (Zhang et al. 2004; Moon et al. 2009). Auch wenn Ghrelin zentral synthetisiert wird, kann peripher gebildetes zumindest im Tiermodell über aktive und passive Mechanismen die Bluthirnschranke überwinden (Banks et al. 2008). Es liegen bisher keine Daten vor, inwieweit im menschlichen Körper peripher gebildetes Ghrelin die Bluthirnschranke überwinden kann.

1.1.2 Synthese und Funktionen

Die Mechanismen der Ghrelin-Regulation sind äußerst komplex. Die Steuerung der basalen Sekretion ist nicht vollständig geklärt, das sympathische Nervensystem und Insulin scheinen hierbei eine Rolle zu spielen (Gagnon et al. 2012). Die tageszeitlichen Schwankungen der Ghrelinausschüttung stehen in engem Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme (Akamizu 2004). Die höchsten individuellen Konzentrationen finden sich präprandial, d.h. in nüchternem Zustand vermittelt durch einen erhöhten efferenten Tonus des N. vagus (Williams 2003). Nach der Nahrungsaufnahme wird Ghrelin unabhängig vom N. vagus durch einen post-duodenalen Prozess supprimiert (Overduin 2004), der Mechanismus ist nicht vollständig geklärt. Etliche Faktoren beeinflussen die Regulation des Ghrelinhaushaltes. **Tabelle 1** zeigt einige der bisher festgestellten Zusammenhänge.

Erhöhtes Ghrelin	Erniedrigtes Ghrelin
Fasten (Akamizu 2004)	Postprandial (Akamizu 2004)
Niedriger BMI (Akamizu 2004)	Hoher BMI (Akamizu 2004)
Weibliches Geschlecht (Akamizu 2004)	-
-	Helicobacter-Pylori Infektion (Boltin et al. 2012)
Hypothyreose (Gjedde et al. 2008)	Hyperthyreose (Gjedde et al. 2008)
Schlafentzug (Spiegel et al. 2004)	-
-	Metabolisches Syndrom (Ukkola 2011)
-	Hohes Alter (Moss et al. 2012)

Tabelle 1: Faktoren, welche die Ghrelinplasmakonzentration erhöhen bzw. erniedrigen

Die Funktionen von Ghrelin sind vielfältig. AG sorgt für eine starke Ausschüttung von growth hormone (GH, deutsch: Wachstumshormon) (Sato et al. 2011). Im Rattenmodell fördert es über eine Modulation des N. vagus auf peripherer und zentraler Ebene die Magensäureproduktion sowie die Magendarmbewegung (Masuda et al. 2000). Im zentralen Hungerzentrum im Nucleus arcuatus des Hypothalamus erhöht AG die Erregbarkeit appetitanregender Neuronenschaltkreise (Pinto 2004). Weiterhin kann AG das Immunsystem beeinflussen, in Abschnitt 1.5.2 werden diese Effekte näher erläutert. DAG kann wegen der fehlenden Oktansäure nicht am GRLN-R binden, der Rezeptor für DAG wurde bisher nicht identifiziert. DAG moduliert die Wirkung von AG auf die Energiehomöostase und Motilität des Magendarmtraktes. Weiterhin beeinflusst DAG die Zellproliferation (Chen et al. 2005). Auf die weiteren endokrinen, kardiovaskulären sowie oszillierenden Wirkungen von Ghrelin wird wegen mangelnder Relevanz bezüglich der Fragestellung der vorliegenden Arbeit nicht näher eingegangen.

1.2 Das idiopathische Parkinsonsyndrom

1.2.1 Definition und Einteilung

Ein Parkinsonsyndrom ist klinisch definiert durch das Vorliegen einer Akinese und eines weiteren Hauptsymptoms im Sinne eines Rigors, Ruhetremors oder einer posturalen Instabilität. Das idiopathische Parkinsonsyndrom (IPS) stellt mit über 75% die häufigste Variante der Parkinson-Syndrome dar. Weniger häufig treten familiäre, sekundäre oder Parkinson-Syndrome im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen wie beispielsweise der Multisystematrophie oder der progressiven supranukleären Blickparese auf. Je nach Ausprägungsgrad der oben genannten Kardinalsymptome kann man das IPS in eine bestimmte Unterform einteilen, z.B. Tremordominanz-Typ (Eggert et al. 2012).

1.2.2 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese

Das IPS tritt typischerweise zwischen dem 50. und 65. Lebensjahr auf und ist mit einer Prävalenz von 0,1 - 0,2 % in Deutschland eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen. Mit steigendem Alter nimmt die Prävalenz bis auf 1% zu. Die Inzidenz beträgt 4-20/100.000 Einwohner und das Lebenszeitrisiko liegt bei 2% (Dodel et al. 1998; Schapira 2009; Eggert et al. 2012).

Das IPS ist eine chronisch voranschreitende neurodegenerative Erkrankung. Für die motorischen Defizite ist der Untergang der dopaminergen Nervenzellen der SNpc

verantwortlich. Die Ursache ist seit der Erstbeschreibung durch den englischen Arzt James Parkinson im Jahre 1817 weiterhin unklar. Jedoch konnten genetische und pathophysiologische Forschungen neue Erkenntnisse erbringen. Auf neuropathologischer Ebene finden sich intrazelluläre Einschlusskörperchen, so genannte Lewy-Körper im Zytosoma und als Lewy-Neuriten in den Fortsätzen der Nervenzellen. Diese bestehen hauptsächlich aus aggregiertem α -Synuklein sowie anderen Proteinkomponenten und sind pathognomisch für die Erkrankung. Die Gründe für diese Proteinaggregationsstörung scheinen vielfältig zu sein. Oxidativer Stress und proteasomale Dysfunktion seien beispielhaft genannt (Trojanowski 1998; Kumar et al. 2012). Wegen dieser Erkenntnisse wird das IPS als α -Synukleinopathie bezeichnet. Die Neurone der SNpc sind nicht als einzige Strukturen des ZNS betroffen. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurden Hypothesen zum Krankheitsverlauf entwickelt, auf die in Abschnitt 1.2.5 näher eingegangen wird.

1.2.3 Klinik und Diagnose

Die Diagnose eines IPS wird anhand der Anamnese und der klinischen Untersuchung gestellt, wobei in der Regel das 3-stufige Verfahren auf Basis der „United Kingdom Brain Bank“ Kriterien angewandt wird. Im ersten Schritt wird das Vorliegen eines Parkinsonsyndroms durch das Vorhandensein von Akinese kombiniert mit mindestens einem der weiteren Hauptsymptome Rigor, Tremor oder Haltungsinstabilität überprüft. Im zweiten Schritt wird eine nicht idiopathische Entität ausgeschlossen. Als Letztes wird nach mindestens drei unterstützenden Kriterien für das Vorliegen eines IPS gesucht. Ein einseitiger Krankheitsbeginn, eine Asymmetrie trotz Progression und das Ansprechen auf L-DOPA sind einige der Möglichkeiten. Das Auftreten von Begleitsymptomen kann wichtige Hinweise zur Diagnosestellung liefern, da sie zum Teil vor den motorischen Defiziten objektivierbar sind. Eine Reihe von Differenzialdiagnosen, wie beispielsweise der Normaldruckhydrozephalus, können ohne Bildgebung (Computertomographie / Magnetresonanztomographie) nicht sicher ausgeschlossen werden. Fakultative Tests sind zur differentialdiagnostischen Abgrenzung in Einzelfällen indiziert (z.B. Riechtest, transkraniale Sonographie oder Polysomnographie) (NCC-CC 2006).

1.2.4 Therapie

Neben begleitenden nicht-medikamentösen Verfahren steht die medikamentöse oder operative Therapie im Vordergrund. Jeder Ansatz wirkt symptomatisch und hält den progressiven Krankheitsverlauf nicht auf.

Die medikamentöse Therapiestrategie richtet sich nach dem Alter und den Komorbiditäten des Patienten. Bei jüngeren Patienten und milder Symptomatik kann prinzipiell eine Monotherapie mit einem Monoaminoxidase-B-Hemmer oder Amantadin versucht werden. Da der symptomatische Effekt dieser beiden Substanzgruppen meist nur schwach ausgeprägt ist, gilt ein Non-Ergot-Dopaminagonist als Therapie der Wahl. Ist der Patient älter oder multimorbide, wird meist eine L-Dopa Monotherapie begonnen.

Die tiefe Hirnstimulation wird als operatives Verfahren bei Patienten angewendet, bei denen die Kernsymptomatik nicht mehr durch eine medikamentöse Therapie in den Griff zu bekommen ist. Ursächlich sind zu starke Wirkungsfluktuationen von L-Dopa in der Langzeitbehandlung. Die Elektroden werden in der Regel im Nucleus subthalamicus stereotaktisch implantiert. (NCC-CC 2006; Eggert et al. 2012).

1.2.5 Modell nach Braak und aktuelle Erkenntnisse

Braak und Kollegen erstellten anhand von Querschnittsuntersuchungen an Verstorbenen 2004 ein Modell, welches das IPS in sechs verschiedene Stadien einteilt: drei präsymptomatische Phasen und drei symptomatische Phasen. Symptomatisch bezieht sich auf die motorischen Defizite der Erkrankung, weswegen die Bezeichnung als prämotorisch und motorisch passender erscheint. In jeder Phase werden immer weitere Teile des zentralen Nervensystem (ZNS) mit den in Abschnitt 1.2.2 beschriebenen Einschlusskörperchen befallen. Dabei weisen die betroffenen Nervenzellen typische Stigmata auf: Projektionsneurone mit langen, dünnen, schwach bis gar nicht myelinisierten Axone. Weiterhin sind ontogenetisch spät myelinisierte Teile des ZNS früh betroffen. Das Befallsmuster folgt einem diese Voraussetzungen erfüllenden neuroanatomischen Pfad in kaudorostraler Richtung.

In **Stadium I** sind dmNV, der Bulbus olfactorius und die vorderen olfaktorischen Kerngebiete betroffen. In weiteren Stadien werden zwar alle weiteren olfaktorischen Gebiete befallen, bleiben aber auf dieses System beschränkt und greifen auf keine weiteren kortikalen Areale über, wohingegen der Krankheitsprozess vom dmNV kontinuierlich aufsteigt. Die anderen Kerngebiete des N. vagus sind vergleichsweise wenig oder gar nicht betroffen. Im **II. Stadium** lassen sich die Einschlusskörperchen in

Strukturen der Formatio reticularis nachweisen: Untere Teile der Raphekerne und der Locus coeruleus–subcoeruleus-Komplex sind betroffen. Die Erkrankung wandert auf diesem Weg von der Medulla oblongata hinauf in den Pons. **Stadium III** befällt das Mittelhirn, und die ersten Lewy-Körper und Lewy Neuriten lassen sich in den Zellen der SNpc nachweisen, wobei deren Funktion noch nahezu vollständig erhalten ist und sich die Erkrankung noch im letzten prämotorischen Stadium befindet. Teile des basalen Vorderhirns, Amygdala und hippokampale Strukturen sind in dieser Phase ebenfalls betroffen. **Stadium IV** befällt nun den Übergang zum Neokortex: Mesocortex und Teile des Thalamus. In der SNpc haben sich so viele α -Synuklein-Aggregate akkumuliert, dass sich die ersten motorischen Defizite entwickeln. Anhand der Kardinalsymptome ist erst jetzt eine klinische Diagnosestellung möglich, obwohl die Erkrankung nach diesem Modell schon lange besteht. In den **letzten beiden Stadien** zeigen Großteile des Neokortex das pathologische Befallsmuster. Das IPS hat seine volle Ausprägung erlangt. **Abbildung 1 und 2** fassen die Stadien graphisch zusammen (Braak et al. 2003; Braak et al. 2004).

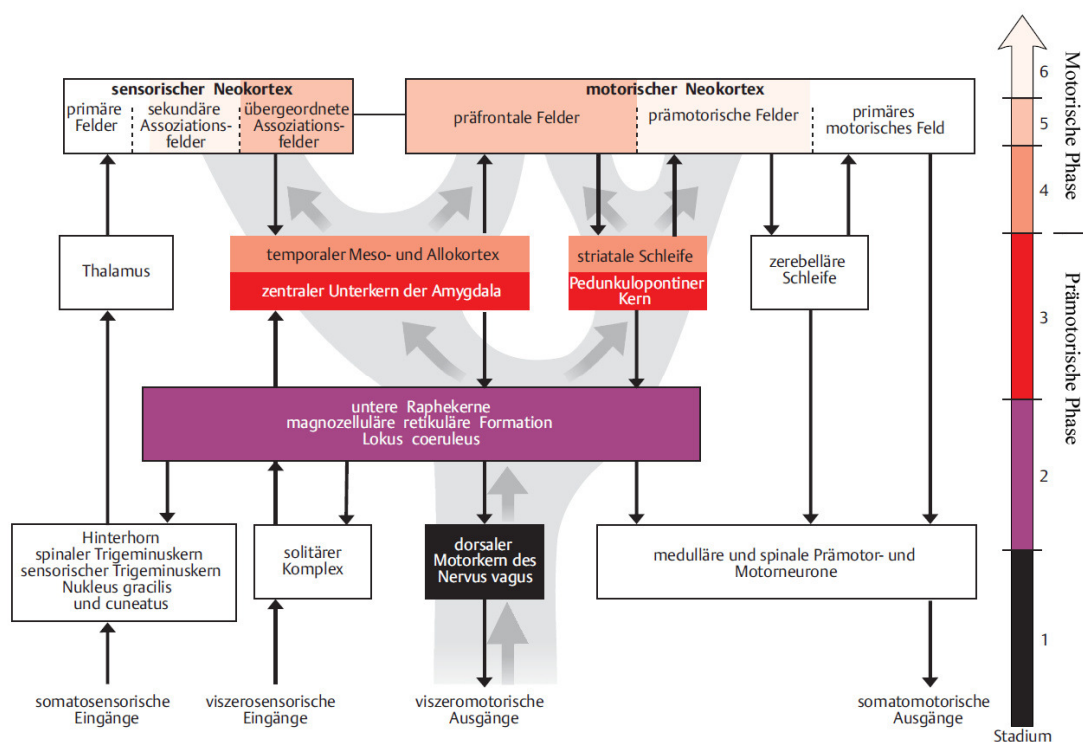


Abb. 1: Ausbreitungswege der Pathologie beim idiopathischen Parkinsonsyndrom. Die olfaktorischen Befallsmuster sind nicht abgebildet. Dünne schwarze Pfeile zeigen die physiologischen Verbindungen der Kerngebiete. Dicke graue Pfeile zeigen die Befallsrichtung an. Die Farben korrespondieren mit denen aus Abbildung 2. Im enterischen Nervensystem startet der Prozess und erreicht den dorsalen Motorkern des Nervus vagus (Stadium 1) und schreitet von dort bis zum Neokortex vor (Stadium 6). Die prämotorische Phase entspricht Stadium 1-3, ab Stadium 4 zeigen sich die typischen motorischen Kardinalsymptome der Erkrankung. [nach (Braak et al. 2010)]

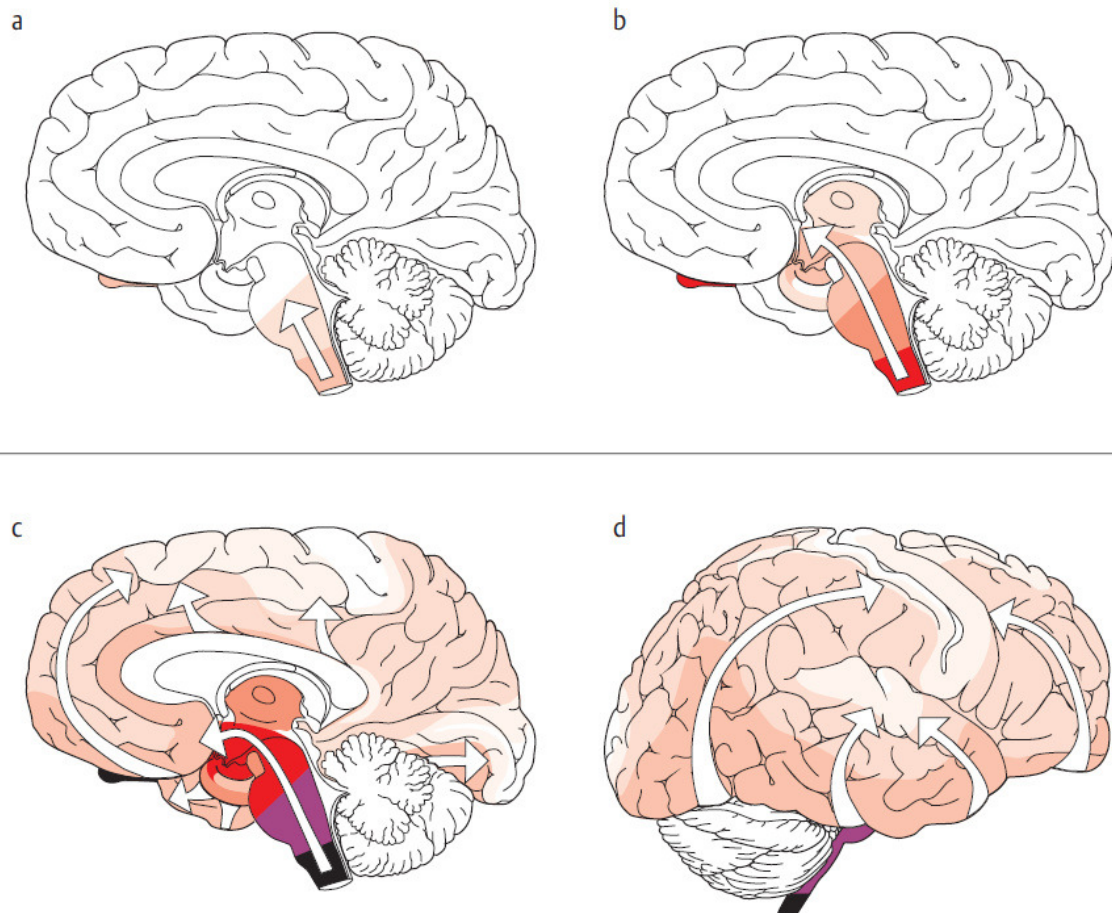


Abb. 2: Ausbreitungswege der Pathologie beim idiopathischen Parkinsonsyndrom. Die weißen Pfeile zeigen das Befallsmuster. Die Farben korrespondieren mit denen in Abbildung 1. Bulbus und Tractus olfactorius sowie der dorsale motorische Vagus Kern sind als Ausgangspunkt im zentralen Nervensystem befallen (a). Im weiteren Verlauf werden angrenzende Kerne des Hirnstammes sowie Mittel- und Vorderhirn befallen (b). Über Teile des Mesokortex und Thalamus (c) erreicht der Prozess die Hirnrinde (d). [nach (Braak et al. 2010)]

Die neuropathologischen Veränderungen sind nach neueren Untersuchungen nicht nur auf die oben beschriebenen Regionen beschränkt. Sie lassen sich ebenfalls prä- und postganglionär in parasympathischen und sympathischen Nerven sowie im thorakalen Rückenmark nachweisen (Braak et al. 2007). Weiterhin treten sie auch nach einigen Jahren in implantierten fetalen dopaminergen Neuronen auf, eine bisher experimentelle Therapieform (Kordower et al. 2008; Li et al. 2010).

Schon in frühen Stadien zeigen Teile des enterischen Nervensystems Lewy-Körper und Lewy-Neuriten: Neurone mit langen, dünnen und schwach myelinisierten Axone im Plexus submucosus und myentericus. Sie lassen sich von oral nach aboral mit einer abnehmenden Häufigkeit nachweisen (Beach et al. 2010). Mit dieser Erkenntnis formulierten Hawkes und Kollegen die so genannte "Dual-hit-Hypothese": Ein noch unbekanntes Pathogen gelangt über zwei Wege in das ZNS. Zum einen anterograd über die Nasenschleimhaut in die olfaktorischen Strukturen. Erreicht das unbekannte

Pathogen durch Herunterschlucken den Verdauungstrakt, kann es alternativ als zweiten Weg über die Magenschleimhaut in das enterische Nervensystem gelangen. Von dort besteht über den N. vagus eine Verbindung bis in die später betroffenen Gebiete des ZNS (Braak et al. 2006; Hawkes et al. 2007).

Eine weitere Hypothese postuliert, dass sich das aggregierte α -Synuklein wie Prionen von Nervenzelle zu Nervenzelle überträgt (Dunning et al. 2012).

Man schätzt die Zeit vom ersten Befall der Neurone der SNpc bis zum Auftreten der dadurch verursachten Symptome auf 5-6 Jahre, wobei ca. 70% der Nervenzellen ihre Funktion verloren haben müssen, bis die ersten motorischen Symptome auftreten. Insgesamt kann sich die prämotorische Phase auf über 20 Jahre belaufen (Fearnley et al. 1991; Savica R 2010).

1.2.6 Die prämotorische Phase

Nicht-motorische Defizite können den motorischen Symptomen des IPS viele Jahre vorausgehen. Sie haben sich in den letzten Jahren immer mehr in den Mittelpunkt der Forschung gestellt. Gerade wenn neuroprotektive Therapieformen in Hinsicht auf eine Marktzulassung zu prüfen sind, ist eine möglichst frühe Diagnosestellung erstrebenswert. Im folgenden Abschnitt werden die für die vorliegende Arbeit relevanten nicht-motorischen Symptome kurz hervorgehoben. Auf weitere nicht-motorische Symptome, wie beispielsweise urogenitale oder kognitive Dysfunktionen, wird nicht näher eingegangen (Tolosa et al. 2009).

Die Motilität von Speiseröhre, Magen und Darm wird von parasympathischen Nervenfasern beeinflusst. **Gastrointestinale Motilitätsstörungen** zeigen sich häufig im Zusammenhang mit dem IPS. Diese imponieren vor allem als Schluckstörungen, verzögerte Magenentleerung und Obstipation. Eine verzögerte Magenentleerung wurde schon mittels Szintigraphie, Atemtest sowie Video-Magnetresonanztomographie nachgewiesen (Hardoff et al. 2001; Goetze et al. 2005; Unger et al. 2010). Obstipation kann den klassischen Motorsymptomen bis zu 20 Jahre vorausgehen (Savica et al. 2009). Für diese gastro-intestinalen Defizite sind wahrscheinlich die in Abschnitt 1.2.5 erläuterten Neurodegenerationen verantwortlich, welche zu einer verminderten intrinsischen und extrinsischen Aktivierung der Motilität des Magendarmtraktes führen. **Riechstörungen** kommen häufig und früh in Zusammenhang mit dem IPS vor. Bei 70-90 % der Patienten lassen sie sich im frühen motorischen Stadium nachweisen. Die Ursache ist noch nicht eindeutig geklärt, aber möglich erscheinen die Ablagerungen in den anterioren olfaktorischen Kerngebieten (Stadium I nach Braak) und der Amygdala

(Stadium III nach Braak) (Katzenschlager et al. 2004). In vielen Fällen findet man eine Assoziation mit der REM-Schlaf-Verhaltensstörung (Stiasny-Kolster et al. 2005).

Die **REM-Schlaf-Verhaltensstörung** (RBD, engl. REM sleep behaviour disorder) ist neben der Riechstörung eines der am intensivsten erforschten Begleitsymptome. Über zwei Drittel aller über 50-Jährigen mit diagnostizierter idiopathischer RBD (iRBD) erleiden nach über 10 Jahren eine neurodegenerative Erkrankung, wie beispielsweise das IPS. Als eine der möglichen Frühstadien des IPS - und somit Risikofaktor - wird in Abschnitt 1.3 näher auf diese Erkrankung eingegangen. Das pathophysiologische Korrelat lässt sich in einem oder mehreren neuronalen Schaltkreisen des Hirnstamms finden, welche in Braaks Stadium I-III betroffen sein können (siehe unten. Abschnitt 1.3.2) (Gagnon et al. 2006; Schenck et al. 2011).

1.3 REM-Schlaf-Verhaltensstörung

1.3.1 Definition und Einteilung

Die REM-Schlaf-Verhaltensstörung (RBD) gehört zu den REM-Schlaf assoziierten Parasomnien. Häufig tritt sie vor oder im Verlauf einer neurodegenerativen Erkrankung auf. Die Assoziation mit dem IPS wurde in Abschnitt 1.2.6 erläutert. Die idiopathische Form (iRBD) ist die spezifischste prämotorische Form des IPS (Postuma et al. 2012). Neuropathologisch entspricht die iRBD einer α -Synukleinopathie (Uchiyama et al. 1995). Sie ist abzugrenzen von sekundären Varianten, wie beispielsweise einer medikamentös-induzierten (ausgelöst unter anderem durch Antidepressiva) oder symptomatischen (bei Hirnstammläsionen) Genese (Gagnon et al. 2006; ISCD-2 2006).

1.3.2 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese

Die Erkrankung tritt typischerweise nach dem 50. Lebensjahr auf und betrifft mit einem Verhältnis von 9:1 eher das männliche Geschlecht. Aus Befragungen über nächtliches aggressives Verhalten wird die Prävalenz auf 0,5% geschätzt. Bei über 70-Jährigen steigt sie auf 0,8% (Gagnon et al. 2006; ISCD-2 2006). Für den Erhalt der physiologischen Muskelatonie während des REM-Schlafs sind Neuronenkreise im Hirnstamm und Rückenmark zuständig. Neueste Untersuchungen zeigen, dass wahrscheinlich glutamaterge Neuronen des sublaterodorsalen Nucleus und GABA-(γ -Aminobuttersäure) sowie glycinerge Neuronen im ventralen Spinalhorn verantwortlich sind. Eine Dysfunktion in diesen Arealen führt zur Symptomatik (Krenzer et al. 2011).

1.3.3 Klinik und Diagnose

Vorwiegend männliche Patienten berichten von angstbesetzten und unangenehmen Träumen, in denen sie beispielsweise von Menschen oder auch Tieren verfolgt oder attackiert werden. Weibliche Patienten berichten weniger von solch aggressiven Traumgehalten. Dadurch könnte die Erkrankung bei Frauen unterdiagnostiziert sein und einen möglichen Grund für den oben genannten epidemiologischen Geschlechtsunterschied darstellen (Bodkin et al. 2009). Die für die REM-Schlafphase typische Muskelatonie ist aufgehoben und folglich werden die Träume verbal und motorisch ausgelebt. Dies führt nicht selten zu Verletzungen. Periodische Extremitätenbewegungen treten häufig auf und stören den Schlaf des Bettnachbarn. Die Diagnosestellung erfolgt mittels Video-Polysomnographie. Ein Nachweis fehlender Atonie während des REM-Schlafs im EMG und Ausschluss epileptoformer Aktivität im EEG ist erforderlich. Anamnestische Verletzungen, potentielle Verletzungen und Erinnern an die Traumgehalten nach dem Erwachen gelten als unterstützende Kriterien. Zuletzt müssen noch andere Ursachen für die Erkrankung, wie beispielsweise eine medikamenteninduzierte oder symptomatische Genese, ausgeschlossen werden (ISCD-2 2006).

1.3.4 Therapie

Es liegen bisher keine kontrollierten Therapiestudien vor. Alle Aussagen beruhen auf Expertenmeinungen. Danach erzielt man die besten therapeutischen Ergebnisse mit niedrig dosiertem Clonazepam. Die Muskelatonie wird durch diese Therapie nicht wiederhergestellt, aber die Häufigkeit und Ausprägung der nächtlichen Traumausschüttung wird reduziert. 10% sprechen nicht auf diese Therapie an. In diesem Fall und bei Kontraindikationen gegenüber Benzodiazepinen gilt Melatonin als Mittel der zweiten Wahl (Gagnon et al. 2006).

1.4 Multiple Sklerose

1.4.1 Definition und Einteilung

Die Multiple Sklerose (MS) ist in Deutschland die häufigste chronische ZNS-Erkrankung im jungen Alter. Zu 80% tritt die Erkrankung schubförmig auf. Initial kann sich die Erkrankung als ein klinisch isoliertes Syndrom (KIS) präsentieren und im weiteren Verlauf in eine schubförmig-remittierende MS (SR-MS) übergehen. Nehmen die Symptome kontinuierlich über mindestens 6 Monate zu, spricht man von einer

progredienten Form, entweder primär oder sekundär nach initialer SR-MS (DGN-Leitlinie 2012).

1.4.2 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese

Es gibt mehr als 120.000 Erkrankte in Deutschland, die jährliche Inzidenz liegt bei ca. 3,5–5 pro 100.000 Einwohner. Der Erkrankungsgipfel liegt um das 30. Lebensjahr. Frauen sind etwa dreimal häufiger betroffen als Männer. Die Erkrankungshäufigkeit steigt mit der Entfernung vom Äquator, ein schützender Effekt der Sonnenstrahlung wird diskutiert (Pierrot-Deseilligny et al. 2010). MS ist eine immunvermittelte chronisch entzündliche Erkrankung des ZNS mit konsekutiver Demyelinisierung und axonalem Schaden. Die Ursache der anhaltenden Immunreaktion im ZNS ist noch nicht geklärt (DGN-Leitlinie 2012).

1.4.3 Klinik und Diagnose

Häufige Erstmanifestationen sind Sensibilitätsstörungen, eine Gangstörung mit oftmals belastungsabhängiger Schwäche der Beine und Gangunsicherheit sowie eine einseitige Optikusneuritis. Bei den meisten Patienten bilden sich die Symptome eines Schubes innerhalb von 1-2 Monaten zurück. Die Diagnose einer MS wird durch den Nachweis der zeitlichen und örtlichen Dissemination und Ausschluss anderer Erkrankungsursachen gestellt. Differenzialdiagnostisch müssen unter anderem chronisch-infektiöse und rheumatische Erkrankungen, Leukodystrophien sowie Sonderformen entzündlich demyelinisierender Erkrankungen ausgeschlossen werden. Zu letzterem Punkt seien vor allem die akute disseminierte Enzephalomyelitis oder Neuromyelitis optica genannt. Das Maß der Krankheitsbeeinträchtigung sollte regelmäßig auf der Expanded Disability Status Scale (EDSS) quantifiziert werden (DGN-Leitlinie 2012).

1.4.4 Therapie

Ein akuter MS-Schub wird mit Glukokortikosteroiden behandelt, bei Symptompersistenz kann eine Plasmapherese oder eine Immunadsorption durchgeführt werden. Für die immunmodulatorische bzw. immunsuppressive Dauertherapie stehen verschiedene Präparate zur Verfügung. Die Therapie des KIS und der SR-MS wird üblicherweise mit Interferon- β oder Glatirameracetat begonnen und bei zunehmender Krankheitsaktivität mit Fingolimod oder Natalizumab eskaliert. Für die progredienten Verlaufsformen wird subkutanes Interferon- β oder eine intermittierende Mitoxantron-Therapie eingesetzt. Mit einer symptomatischen Therapie kann individuell durch

weitere Medikamente, Physiotherapie, Ergotherapie, Logopädie und psychologische Therapie die Lebensqualität deutlich verbessert werden (DGN-Leitlinie 2012).

1.5 Ghrelin und die untersuchten Erkrankungsbilder

1.5.1 RBD / IPS und Ghrelin

In den prämotorischen Phasen des IPS zeigen unter anderem Teile des N. vagus und des enterischen Nervensystems die pathognomonischen Proteinaggregate (siehe Abschnitt 1.2.5). Der N. vagus ist bei der Ghrelinausschüttung beteiligt (siehe Abschnitt 1.1.2), eine Schädigung des N. vagus könnte daher auch Auswirkungen auf die Ghrelinausschüttung haben. Viele Parkinson Patienten leiden an Magenentleerungsstörungen und Obstipation – ein nicht-motorisches Symptom, auf das Ghrelin ebenfalls einen Einfluss haben könnte. In den vorherigen Abschnitten wurde bereits erläutert, dass Patienten mit iRBD häufig ein prämotorisches Stadium eines IPS darstellen (siehe Abschnitt 1.2.6). Es gibt bisher nur eine Studie, die Ghrelin durch multiple Blutentnahmen im Rahmen einer Testmahlzeit bei Patienten mit IPS und iRBD untersucht hat. Dort konnte bei beiden Patientengruppen ein verminderter Ghrelinanstieg in der späten postprandialen Phase festgestellt werden (Unger et al. 2011). Es zeigte sich kein Unterschied in den Einzelwerten sowie der Fläche unter der Kurve (Ghrelingesamtkonzentration während der Untersuchung). Mit dem verwendeten Radioimmunassay (RIA) war eine Differenzierung der Hormonunterformen AG und DAG nicht möglich.

1.5.2 Multiple Sklerose und Ghrelin

Das Phänomen, dass sich Autoimmunerkrankungen unter Fasten symptomatisch verbessern, ist bis heute ungeklärt. In der Literatur diskutierte Erklärungsansätze stellen häufig Hormone des Magen-Darm-Traktes in den Mittelpunkt. Ghrelin wurde erst eine pro-inflammatorische Wirkung durch Anstieg der Lymphozyten im Blut zugesprochen. Jedoch stellte sich heraus, dass sich im Tiermodell das klinische Bild von entzündlichen Darmerkrankungen, Arthritis oder Sepsis durch exogenes Ghrelin besserte. Ghrelinrezeptoren lassen sich auf nahezu allen Zellreihen des Immunsystems nachweisen. Ghrelin scheint auf verschiedenen Wegen seine anti-inflammatorische Wirkung zu entfalten. Es hemmt NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells), einen essentiellen Transkriptionsfaktor vieler inflammatorischer Zytokine: vor allem Interleukin-1 β , Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor- α . Zusätzlich schwächt es eine vom T-Helferzell-Typ-1 induzierte Immunreaktion ab. Die durch AG

ausgeschütteten Hormone GH und IGF-1 (insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1, engl. insulin-like growth factor 1) wirken ebenfalls inhibitorisch auf das Immunsystem (Hattori et al. 2001; Gonzalez-Rey et al. 2006; Miyake et al. 2009).

Bei der experimentell autoimmunen Enzephalomyelitis, einem Tiermodell der MS, konnte Ghrelin über Beeinflussung der Mikroglia eine deutliche Besserung der Symptome bewirken (Theil et al. 2009). In einer Studie hatten Patienten mit SR-MS und sekundär-progredienter MS (SP-MS) signifikant höhere Nüchternghrelinspiegel im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (Berilgen et al. 2005). Die Ursache ist unklar, laut Autoren wäre ein Kompensationsmechanismus gegenüber dem chronischen Entzündungsreiz ein möglicher Erklärungsansatz. Eine separate Messung der Hormonunterformen AG und DAG ist bisher in keiner der publizierten Studien erfolgt.

1.6 Ziel der Arbeit

Es soll untersucht werden, ob sich die an einem ersten Patientenkollektiv festgestellte Störung der Ghrelinsekretion bei Patienten mit Parkinson Erkrankung oder REM-Schlaf-Verhaltensstörung (Unger et al. 2011) an einem zweiten Patientenkollektiv reproduzieren lässt. Außerdem sollen ebenfalls Patienten mit Multiple Sklerose hinsichtlich ihrer Ghrelinausschüttung im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen untersucht werden. Mit dem verwendeten Messverfahren (ELISA, engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay) lässt sich feststellen, welche Hormonunterform (AG / DAG) für die möglicherweise veränderten Plasmakonzentrationen verantwortlich ist. Dies ist von Interesse, da sich AG und DAG in ihrer Wirkung deutlich unterscheiden (siehe Abschnitt 1.1).

Diese Fragestellung ist hinsichtlich dreier Punkte für die Wissenschaft relevant. Zum einen kann es zum Verständnis der Pathophysiologie der Erkrankungen beitragen. Zum anderen könnte ein Biomarker im Blut als zusätzliches Diagnosekriterium dienen und letztlich stellt sich die Frage, ob man die gestörte Ghrelinausschüttung therapeutisch beeinflussen kann.

2 Probanden und Methoden

Die vorliegende Studie fand im Zeitraum von Februar 2010 bis Juli 2012 an der Klinik für Neurologie der Philipps-Universität Marburg statt. Die Ethik-Kommission des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg befürwortete die Durchführung der Studie mit einem positiven Votum (Studie 187/09).

2.1 Probandenkollektiv

Die Rekrutierung der Patienten erfolgte aus der Parkinsonambulanz, der neuroimmunologischen Sprechstunde, aus dem kliniksinternen RBD-Register sowie direkt von den Stationen der Klinik für Neurologie am Universitätsklinikum Marburg. Die Kontrollgruppe setzte sich größtenteils aus Ehepartnern der erkrankten Probanden und Freiwilligen aus dem persönlichen Umfeld zusammen. Alle untersuchten Personen erhielten ein Informationsschreiben sowie eine mündliche Aufklärung über den wissenschaftlichen Hintergrund, über Ablauf und Risiken. Anfallende Kosten durch Anfahrt oder Übernachtung wurden von der Klinik erstattet. Der Datenschutz erfolgte per Anonymisierung aller Patientendaten. Jeder Proband konnte die Studie jederzeit ohne Angabe von Gründen abbrechen.

Die Stichprobengröße wurde basierend auf Daten einer vergleichbaren Arbeit berechnet (Unger et al. 2011). Bei einer Gruppengröße von 23 Personen besteht eine Teststärke von 0,8 und ergibt eine Gesamtgröße von 92 Teilnehmern. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 109 Probanden untersucht. Davon mussten 13 vor der Auswertung aus unterschiedlichen Gründen (z.B. weil im Verlauf die ursprüngliche Diagnose revidiert werden musste oder ein adäquaterer Kontrollproband rekrutiert wurde) ausgeschlossen werden. Somit konnten 96 Probanden in die Auswertung eingeschlossen werden:

- 15 Patienten mit neudiagnostiziertem IPS - ohne Therapie (A)
- 25 Patienten mit bekanntem IPS - unter Therapie (B)
- 15 Patienten mit iRBD (C)
- 16 Patienten mit einem KIS bzw. SR-MS (D)
- 25 gesunde Kontrollpersonen (E)

2.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Die nachfolgenden Kriterien ergeben sich aus juristischen Gründen sowie möglichen Störfaktoren infolge zusätzlicher Krankheitsbilder oder Medikation.

Allgemein geltende Einschlusskriterien:

- Männliche und weibliche Personen im Alter zwischen 18 und 80 Jahren
- Schriftliches Einverständnis zur freiwilligen Teilnahme an der Studie
- Fähigkeit, Risiken und Komplikationen der Untersuchungen zu verstehen und zu beurteilen

Allgemein geltende Ausschlusskriterien:

- Nicht einwilligungsfähige Personen
- Schwangerschaft
- Personen, die Medikamente einnehmen oder innerhalb der letzten 14 Tage eingenommen haben, welche die Motilität des Magendarmtraktes beeinflussen oder Ghrelin potentiell (dys)regulieren (Domperidon, Metoclopramid, Anticholinergika sowie sämtliche trizyclischen Antidepressiva)
- Cortisontherapie in den letzten 6 Wochen
- Schilddrüsenfunktionsstörungen
- Polyneuropathie
- Operation am Magendarmtrakt (Appendektomie ausgenommen)

Zusatzkriterien für Gruppe A (neudiagnostiziertes IPS - ohne Therapie):

Einschluss:

- Diagnose eines IPS entsprechend den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie

Ausschluss:

- Diagnose einer SR-MS oder eines KIS
- Einnahme einer dopaminergen oder anderweitigen Anti-Parkinson-Medikation

Zusatzkriterien für Gruppe B (bekanntes IPS - unter Therapie):

Einschluss:

- Diagnose eines IPS entsprechend den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie mit einer Krankheitsdauer von mindestens 6 Monaten und Einnahme einer dopaminergen Medikation über einen Zeitraum von mindestens 3 Monaten

Ausschluss:

- Diagnose einer SR-MS oder eines KIS

Zusatzkriterien für Gruppe C (iRBD):Einschluss:

- Diagnose RBD entsprechend den Kriterien der International Classification of Sleep Disorders Revised (ICSD-R)

Ausschluss:

- Diagnose einer SR-MS oder eines KIS

Zusatzkriterien für Gruppe D (KIS / SR-MS):Einschluss:

- Diagnose einer SR-MS oder eines KIS entsprechend den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie

Ausschluss:

- Diagnose einer Erkrankung der Probandengruppe A - C
- Bestehende oder vorangegangene immunmodulatorische Therapie (z.B. β -Interferone, Glatirameracetat, Azathioprin, Cyclophosphamid, Mitoxantron, Natalizumab, intravenöse Immunglobuline)

Zusatzkriterien für Gruppe E (gesunde Kontrollpersonen):Ausschluss:

- Diagnose einer Erkrankung der Probandengruppe A – D

2.2 Versuchsdurchführung

Am vereinbarten Untersuchungstag wurden die Probanden zwischen 8 und 9 Uhr nüchtern einbestellt. Die genaue Uhrzeit wurde anhand der individuellen Frühstücksgewohnheiten ermittelt. Die letzte feste Mahlzeit und Flüssigkeit durfte am Vorabend bis 22 Uhr eingenommen werden. Gleiches galt für den Zigarettenkonsum. Probanden der Gruppe B (bekanntes IPS - unter Therapie) mussten sich zwecks Schweregradeinstufung ihrer Erkrankung und Standardisierung im „Off“ befinden, somit erfolgte die letzte Einnahme dopaminerger Medikamente vor mindestens 12 Stunden. Als Zeitpunkt zur Errechnung der Erkrankungsdauer wurde für Probandengruppe A und B die motorische - und im Falle von Gruppe C alternativ auch verbale - Erstmanifestation gewählt. Für Gruppe D wurde der erste Schub gewertet.

Die Testmahlzeit (ca. 435 kcal) bestand aus einem Kaiserbrötchen (ca. 270 kcal), einem Spiegelei (Handelsklasse M, ca. 90 kcal), 10 g Butter (ca. 75 kcal) und 250 ml kohlenstoffsaurefreies Wasser. Sie sollte innerhalb eines Zeitraums von 10 Minuten eingenommen werden.

Die Blutentnahmen erfolgten zu acht definierten Zeitpunkten aus einem venösen Zugang am Handrücken oder Unterarm:

1. Nüchternwert (vor der Testmahlzeit)
2. 0. Minute (direkt nach der Testmahlzeit)
3. 30. Minute
4. 60. Minute
5. 120. Minute
6. 180. Minute
7. 240. Minute
8. 300. Minute

Pro Blutentnahmen wurden 2x 2,6 ml EDTA-Monovetten verwendet, jeweils eine für AG und eine für DAG. Die Monovette für AG enthielt 26 µl des Proteaseinhibitors p-Hydroxymercuribenzoic acid (PHMB) [10 µl pro 1 ml Blut]. Die Monovette für DAG erforderte keinen weiteren Zusatz. Zusammengerechnet benötigte man pro Proband 16 Monovetten mit einer Gesamtblutentnahme von 41,6 ml Blut.

Der Proband durfte während der kompletten Untersuchung keine weitere Nahrung oder Flüssigkeit zu sich nehmen. Kaugummi- oder Zigarettenkonsum war untersagt, die körperliche Bewegung sollte auf ein Minimum reduziert werden.

Zwischen den Blutentnahmen erfolgte neben der Anamnese eine neurologische und internistische Untersuchung. Weiterhin wurden sechs Fragebögen mit dem Patienten gemeinsam bearbeitet, um die kognitiven Fähigkeiten, die derzeitige Stimmungslage und die Ausprägung der Parkinsonkrankheit oder REM-Schlaf-Verhaltensstörung zu bestimmen. Eine genaue Erläuterung der Fragebögen findet sich in Kapitel 2.2.1.

Jede Blutprobe wurde zeitnah (<30 Minuten) mit 3500 Umdrehungen pro Minute (ca. 2200 G) bei 4 °C 10 Minuten lang zentrifugiert. Das Blutplasma der DAG-Monovette wurde unmittelbar nach der Zentrifugation bei -20 °C in Cluster-Tubes tiefgefroren. Der Überstand der AG-Monovette, versetzt mit 120 µl 1 N Salzsäure [100 µl pro 1 ml Plasma], wurde für weitere 5 Minuten mit 3500 Umdrehungen pro Minute (ca. 2200 G) bei 4 °C zentrifugiert und anschließend ebenfalls in Cluster-Tubes tiefgefroren.

Die Auswertung erfolgte mit zwei separaten Ghrelin ELISA Kits (human acylated / unacylated) basierend auf der Sandwich-Technik: Der an der Mikrotiterplatte fixierte erste Antikörper bindet die jeweilige Ghrelinunterform am C-terminalen Abschnitt. Ein zweiter Antikörper ist mit einer Acetylcholinesterase verknüpft und bindet an das N-terminale Ende. Das hinzugefügte Ellman-Reagenz reagiert mit den freien Sulfhydrylgruppen der Acetylcholinesterase zu einem intensiv gelb gefärbten Produkt.

Die Farbintensität korreliert mit der Ghrelinkonzentration und kann mit einem Spektrophotometer quantifiziert werden.

Im Rahmen des Kalibrierungsprozesses wurden die Standardwerte der Ghrelinkonzentrationen auf der ELISA-Platte mit einer Verdünnung von 125 pg/ml bis 0,98 pg/ml festgelegt. Abgesehen von dieser Modifikation wurde nach den Anweisungen des Herstellers „SPI-Bio“ vorgegangen.

Bei einigen Probanden wurden im ELISA zu niedrige, zu hohe oder nicht messbare Konzentrationen detektiert. In diesen Fällen erfolgte eine erneute Bestimmung, gegebenenfalls mit angepasster Verdünnung. Aus allen Mehrfachbestimmungen wurde für die Auswertung der Mittelwert gebildet. Insgesamt waren 19 Probanden davon betroffen: 2 mit IPS ohne Therapie (A), 5 mit IPS unter Therapie (B), 3 mit iRBD (C), 4 mit MS (D) und 5 Kontrollpersonen (E).

2.2.1 Fragebögen

In diesem Abschnitt werden die verwendeten sechs Fragebögen vorgestellt:

Mit Hilfe des „**Unified Parkinson Disease Rating Scale**“ (**UPDRS**) (Fahn et al. 1987) wird die Ausprägung der Parkinsonerkrankung anhand eines Punktwerts beschrieben. Es wurde Teil I-III des UPDRS durchgeführt. In Teil I werden vier Fragen zu kognitiven Funktionen, Stimmung und Verhalten gestellt. In Teil II kann mittels dreizehn Fragen die Beeinträchtigung bei Aktivitäten des täglichen Lebens, wie beispielsweise Hygiene, Sprache oder Ankleiden, festgestellt werden. Teil III prüft die Ausprägung der motorischen Symptome. Für jede Frage bzw. Untersuchung wird ein Punktwert zwischen 0 und 4 vergeben. 0 Punkte steht für keine oder schwache und 4 Punkte für die stärkste Beeinträchtigung. Somit können in Teil I 0 bis 16, in Teil II 0 bis 52 und in Teil III 0 bis 108 Punkte erreicht werden.

Auch die Einteilung der Parkinsonkrankheit nach „**Hoehn und Yahr**“ (**H&Y**) (Hoehn et al. 1967) beschreibt die Ausprägung der Parkinsonerkrankung, wobei zwischen fünf Stadien unterschieden wird. Stadium I ist durch eine milde einseitige Symptomatik gekennzeichnet. Stadium II wird durch eine beidseitige Beeinträchtigung definiert. Stadium III zeichnet sich durch eine mäßige Beeinträchtigung vor allem beim Gangbild aus. Im Stadium IV ist der Patient stark beeinträchtigt und benötigt bei vielen Tätigkeiten Hilfe. Im letzten Stadium V ist der Patient bettlägerig und muss vollständig versorgt werden.

Zur Beurteilung der kognitiven Fähigkeiten wurde der „**Mini-Mental-Status-Test**“ (**MMST**) (Folstein et al. 1975) durchgeführt. Der Patient musste Aufgaben zur

zeitlichen und örtlichen Orientierung, Merk- und Rechenfähigkeit, Sprach- und Schriftverständnis lösen sowie eine visokonstruktive Leistung erbringen. Insgesamt können bei dieser Skala maximal 30 Punkte erreicht werden. Ab Werten unterhalb von 25 Punkten liegt ein pathologischer Befund vor. Eine Punktzahl von unter 20 weist auf eine leichte bis mittlere Demenz hin, eine schwere Form liegt bei einer Punktzahl von unter 10 vor.

Die unter Parkinson auftretenden Kognitionsstörungen unterscheiden sich in einigen Punkten von anderen Demenzformen. Im Vordergrund stehen Defizite bei Planung, Aufmerksamkeit, Gedächtnis und visuell-räumlichen Fähigkeiten. Der oben beschriebene Mini-Mental-Status-Test deckt diese Felder nur unzureichend ab. Aus diesem Grund wurde ein weiterer kognitiver Test durchgeführt: der **„Parkinson Neuropsychometric Dementia Assessment“ (PANDA)** (Kalbe et al. 2008). Dieser ist zweigeteilt, Teil A untersucht das Assoziationslernen, das Arbeitsgedächtnis sowie das visuell räumliche Vorstellungsvermögen. In Teil B werden drei Fragen zur aktuellen Stimmung beantwortet. Punkte werden je nach Altersgruppe (jünger oder älter als 60 Jahre) vergeben, wobei insgesamt 30 Punkte erreicht werden können. Alle Ergebnisse über 18 Punkte gelten als unauffällig, 15 bis 17 Punkte deuten auf diskrete kognitive Dysfunktionen hin und bei unter 14 Punkten ist von einer demenziellen Symptomatik auszugehen.

Zur Klassifikation einer REM-Schlaf-Verhaltensstörung wurde der Fragebogen **„REM Sleep Behavior Disorder Screening Questionnaire“ (RBDSQ)** (Stiasny-Kolster et al. 2007) bearbeitet. Dieser Test besteht aus 13 mit Ja oder Nein zu beantwortenden Fragen über das Schlafverhalten des Patienten. Häufig sind einzelne der abgefragten Symptome dem Patienten nicht bewusst. Der RBDSQ erlaubt daher, auch die Angaben von anderen (z.B. Ehepartnern) einzubeziehen. Ab fünf mit „Ja“ angekreuzten Fragen ist der Test als Indikator für das Vorliegen einer RBD zu werten.

Der **Beck Depression Inventory II (BDI-II)** (Beck et al. 1996) dient zur Erfassung des Schweregrades depressiver Beschwerden. Der Test ist ein Selbstbeurteilungsbogen, der mit 21 Fragen die mögliche Symptomatik einer Depression abfragt. Jede Frage hat vier Auswahlmöglichkeiten, wobei von 0 bis 3 die Ausprägung des geprüften Symptoms, wie z.B. Schuldgefühle oder Entschlusslosigkeit, steigt. Der Patient soll die zutreffende Möglichkeit hinsichtlich der letzten 14 Tage ankreuzen. Eine Gesamtpunktzahl von 63 kann erreicht werden, ein Ergebnis über 8 Punkte wird als pathologisch angesehen.

2.2.2 Geräte- und Materialliste

Geräteliste:

10-100 µl, 20-200 µl und 200-1000 µl Pipette (Eppendorf)
 Zentrifuge (Heraeus Megafuge 11R, Thermo scientific, Bestellnummer 75004412)
 Schüttler (Heidolph Duomax 1030, Bestellnummer 543-32205-00)
 Elisa-Reader (Dynex MRX, Bestellnummer 20310)

Materialliste:

Multiadapter für S-Monovette (Sarstedt, Bestellnummer 14.1205)
 Mandrin / Stylet (Braun, Artikelnummer 4219104)
 Sicherheitsvenenverweilkatheter (Braun, Artikelnummer 4268113S-01)
 Safety-Multifly-Kanülen für S-Monovette (Sarstedt, Bestellnummer 85.1638.205)
 Pipettenspitzen (Greiner)
 S-Monovetten EDTA 2,6 ml (Sarstedt, Bestellnummer 04.1901)
 Röhren-Tubes (Sarstedt, Bestellnummer 55.475)
 8-Strip Cluster Tubes (Corning Incorporated, Corning No. 4408)
 Deckel für 8 Cluster Tubes (Corning Incorporated, Corning No. 4418)
 Ghrelin (human acylated) ELISA Kit (SPI-Bio, Cayman Chemical Item Number 10006306)
 Ghrelin (human unacylated) ELISA Kit (SPI-Bio, Cayman Chemical Item Number 10008952)
 1 N Salzsäure (Merck, Bestellnummer 1090571000)
 PHMB (nach ELISA Anleitung)

2.3 Zielgrößen und statistische Auswertung

Als gängigen Auswertungsparameter in endokrinologischen Studien wird die "area under the curve" (AUC) verwendet. Es gibt zwei Berechnungsvarianten der AUC, beide beruhen auf der Trapezregel. "Area under the curve - ground" (AUC-G) misst die komplette Fläche unter der Kurve und "area under the curve - increase" (AUC-I) setzt den ersten Messwert als Referenz und subtrahiert den Abstand zwischen diesem und der x-Achse. Somit spiegelt AUC-G die Gesamtkonzentration wider, wohingegen mit der AUC-I als dynamische Fläche der Kurvenverlauf besser beschrieben wird. AUC-G kann nur positive Werte annehmen, wohingegen AUC-I bei überwiegend negativer Steigung der Kurve auch negative Werte annehmen kann (Pruessner et al. 2003). Die AUC wurde für AG und DAG separat berechnet. Somit entstehen für jede Gruppe vier Werte: AUC-G-AG, AUC-G-DAG, AUC-I-AG und AUC-I-DAG. Die Nüchternkonzentration

(Baseline) sowie das DAG:AG-Verhältnis werden als zusätzliche Parameter ausgewertet.

Als statistisches Verfahren für die vier auszuwertenden Gruppen (IPS, iRBD, MS, Kontrollen) wurde eine Analyse der Kovarianzen gewählt (ANCOVA) und für Alter, BMI sowie Geschlecht korrigiert. Bei den Vergleichen Kontrollen gegen iRBD und Kontrollen gegen IPS wurde der p-Wert für multiples Testen mit der Bonferroni-Korrektur angepasst, wohingegen der Vergleich Kontrolle gegen KIS/SR-MS als eigenständig betrachtet wurde. Nach wissenschaftlichem Standard belief sich die Irrtumswahrscheinlichkeit α auf 5%. Für alle statistischen Berechnungen wurde die Software SPSS Version 17 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) verwendet.

3 Ergebnisse

In diesem Kapitel basieren alle Tabellen und Abbildungen mit Ausnahme von Tabelle 3, Abbildung 16 und Abbildung 17 (diese werden im Text und in der Beschriftung explizit als korrigierte Darstellungen beschrieben) auf unkorrigierten Daten.

3.1 Probandenkollektiv

Die demographischen Daten und Ergebnisse der Fragebögen sind in **Tabelle 2** zusammengefasst. Bei allen Teilnehmern konnte ein vollständiger Datensatz erhoben werden.

Die Probandengruppe IPS (A+B) und iRBD (C) zeigt einen hohen männlichen Anteil, wohingegen die Kontrollgruppe (E) einen hohen weiblichen Anteil aufweist. Die Altersverteilung ist bis auf die deutlich jüngere Gruppe KIS / SR-MS (D) homogen. Keine Gruppe zeigt stark abweichende BMI-Werte. Die Gruppe des IPS (A+B) zeigt hohe, iRBD-Erkrankte (C) zeigen tendenziell höhere UPDRS-Werte gegenüber den anderen beiden Gruppen. In den Ergebnissen der kognitiven Tests MMST und PANDA zeigen sich in allen Gruppen ähnliche Werte. Im RBDSQ erreichten Patienten mit iRBD (C) gefolgt von denen mit IPS (A+B) die höchsten Werte. Alle Teilnehmer konnten die Testmahlzeit in einem vergleichbaren Zeitraum einnehmen.

	IPS-ohne Therapie (A)	IPS-unter Therapie (B)	iRBD (C)	KIS / SR-MS (D)	Kontrollpersonen (E)
Demographische Daten					
Probandenanzahl	15	25	15	16	25
Geschlecht (w:m)	7:8	9:16	0 : 15	8:8	16:9
Alter in Jahren	60 ± 11,5 [40-77]	60 ± 8 [45-73]	68 ± 4,7 [59-74]	34 ± 9,6 [19-52]	60 ± 10,4 [30-76]
BMI (kg/m²)	26,9 ± 5,0 [19,5-37,9]	26,4 ± 3,8 [18,9-34]	26,3 ± 2,2 [22,0-31,3]	28,1 ± 5,1 [20,3-38,8]	26,4 ± 4,3 [20,3-37,1]
Erkrankungsdauer (Monate)	24,4 [1-160]	74,5 [12-236]	83,5 [10-351]	32,9 [2-120]	-
Klinische Befunde					
UPDRS Teil I	2,3 ± 1,9 [0-5]	2,5 ± 1,8 [0-8]	3,3 ± 1,7 [1-7]	0,9 ± 1,2 [0-5]	1,2 ± 1 [0-3]
UPDRS Teil II	7,5 ± 4,0 [1-17]	9,4 ± 3,0 [3-17]	1,9 ± 2,1 [0-6]	0,2 ± 0,4 [0-1]	0,2 ± 0,5 [0-2]
UPDRS Teil III	18,0 ± 6,5 [7-30]	19,3 ± 8,9 [7-38]	4,6 ± 3,7 [0-13]	0,7 ± 1,3 [0-4]	1,1 ± 2,0 [0-8]
UPDRS Gesamtpunkte	27,8 ± 10,4 [17-51]	31,2 ± 10,7 [10-60]	9,7 ± 5,5 [2-23]	1,8 ± 2,5 [0-9]	2,5 ± 2,3 [0-9]
PANDA Kognition	23,2 ± 4,5 [17-30]	23,4 ± 5,0 [11-30]	24,0 ± 4,8 [15-30]	24,2 ± 3,2 [17-28]	23,2 ± 5,0 [10-30]
MMST	28,9 ± 1,2 [27-30]	28,9 ± 1,2 [26-30]	28,6 ± 1,2 [26-30]	29,1 ± 1,2 [26-30]	28,9 ± 1,3 [26-30]
BDI-II	7,6 ± 6,5 [1-20]	7,8 ± 5,6 [0-21]	6,7 ± 5,9 [0-19]	6,4 ± 5,7 [0-24]	4,3 ± 4,5 [0-13]
H&Y	1,1 ± 0,5 [0-2]	1,6 ± 0,6 [1-3]	-	-	-
RBDSQ	3,9 ± 3,2 [1-12]	3,8 ± 3,0 [1-11]	9,3 ± 2,9 [3-13]	2,9 ± 1,5 [1-6]	1,5 ± 1,4 [0-6]
Zeit für Testmahl (Minuten)	7,9 ± 2,5 [4-13]	7,6 ± 1,8 [4-11]	7,9 ± 2,3 [4-10]	6,0 ± 2,2 [3-10]	9,0 ± 1,8 [4-12]

Tabelle 2: Demographische und klinische Befundübersicht des Patientenkollektivs

3.2 Ghrelinkonzentrationen der Auswertungsparameter

Die beiden IPS-Gruppen (A+B) zeigen einen nahezu identischen Kurvenverlauf (**Abbildungen 3 und 4**) und wurden daher zwecks besserer Übersicht für alle weiteren Analysen und Abbildungen zusammengefasst.

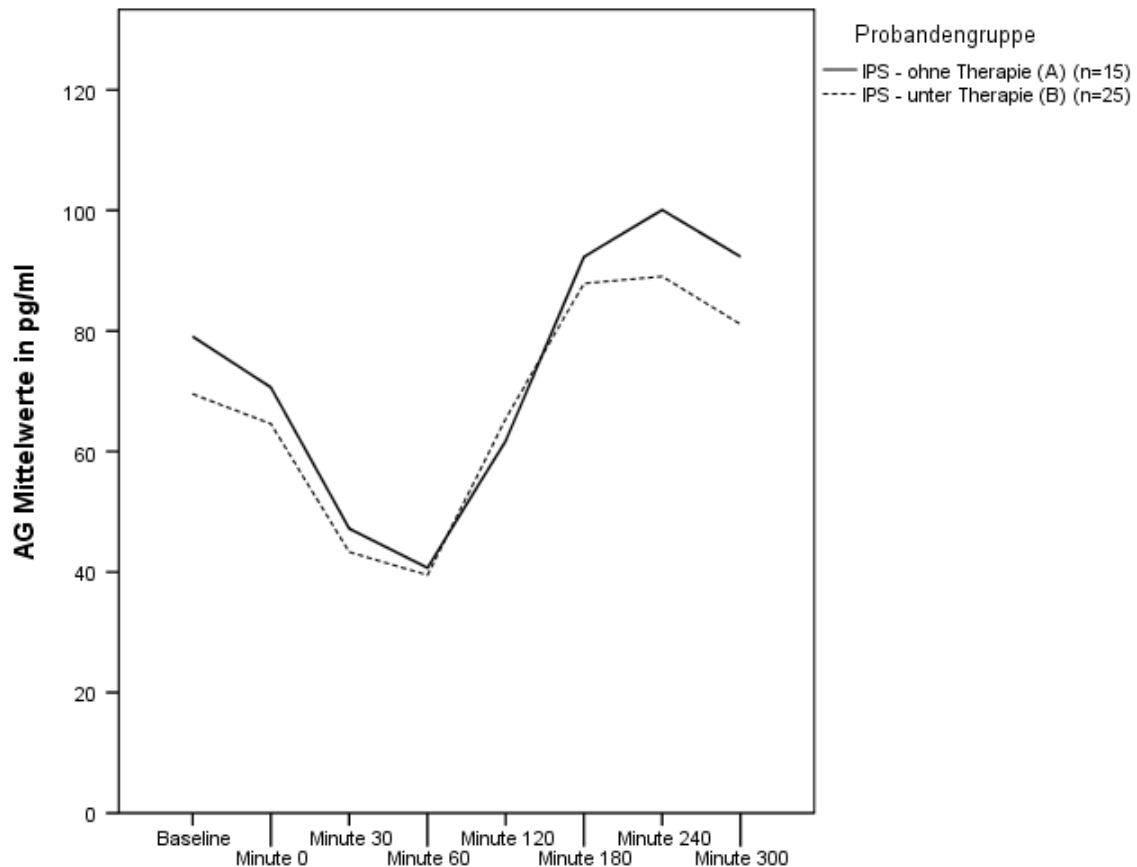


Abb. 3: Mittelwerte der acetylierten Ghrelinform beider IPS-Gruppen im Verlauf der Untersuchung. Die y-Achse entspricht der Serumkonzentration in pg/ml. Die x-Achse zeigt die 8 Zeitpunkte der Blutentnahmen. Zur besseren Veranschaulichung wurde für diese Abbildung ein identischer Zeitabstand der Blutentnahmen angenommen.

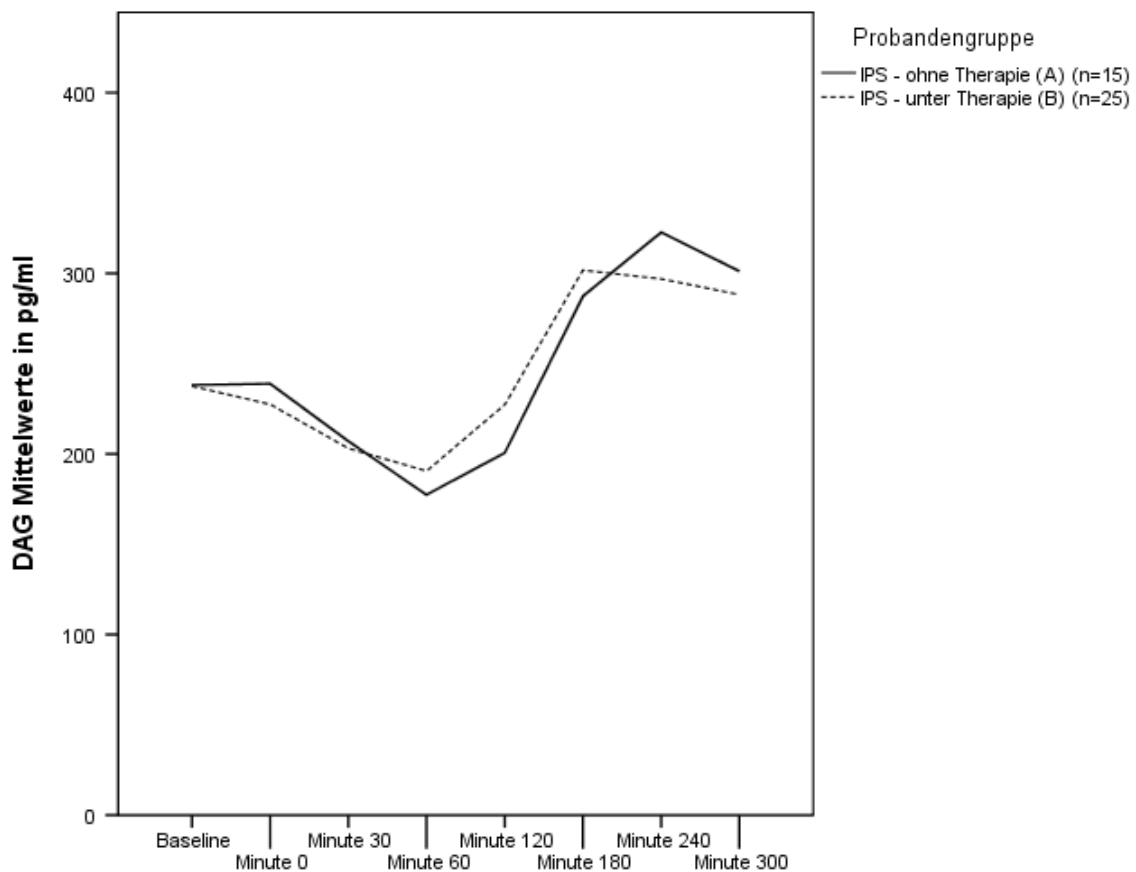


Abb. 4: Mittelwerte der desacetylierten Ghrelinform beider IPS-Gruppen im Verlauf der Untersuchung. Die y-Achse entspricht der Serumkonzentration in pg/ml. Die x-Achse zeigt die 8 Zeitpunkte der Blutentnahmen. Zur besseren Veranschaulichung wurde für diese Abbildung ein identischer Zeitabstand der Blutentnahmen angenommen.

Abbildungen 5 und 6 zeigen die Mittelwerte der jeweiligen Probandengruppen für die beiden Unterformen AG und DAG. Eine zusätzliche Darstellung von Konfidenzintervallen, Standardfehlern oder Standardabweichungen führte zu mangelnder Übersicht und Zuordnung zu der jeweiligen Gruppe, weshalb auf eine Darstellung verzichtet wurde (siehe Mittelwerte und Standardabweichungen der AG- und DAG-Nüchternwerte in Tabelle 4). Alle Patientengruppen liegen bei Betrachtung der Mittelwertskurve deskriptiv etwas niedriger als die Kontrollgruppe.

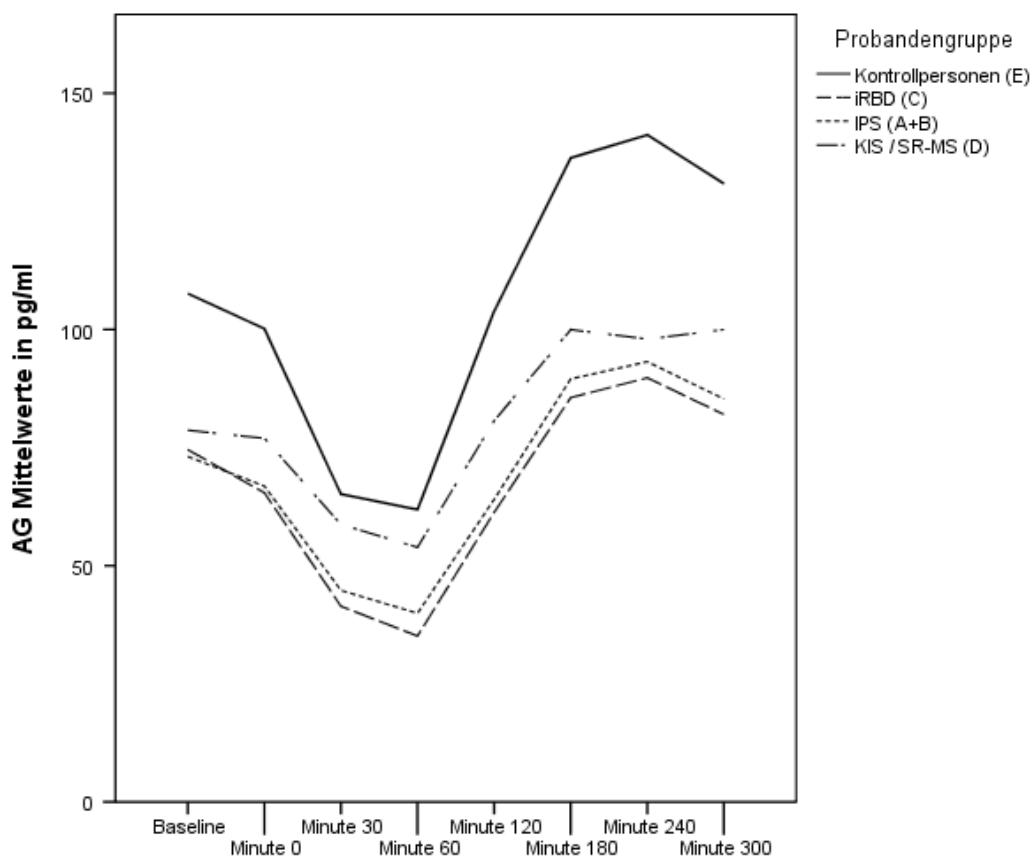


Abb. 5: Mittelwerte der acetylierten Ghrelinform im Verlauf der Untersuchung. Die y-Achse entspricht der Serumkonzentration in pg/ml. Die x-Achse zeigt die 8 Zeitpunkte der Blutentnahmen. Zur besseren Veranschaulichung wurde für diese Abbildung ein identischer Zeitabstand der Blutentnahmen angenommen.

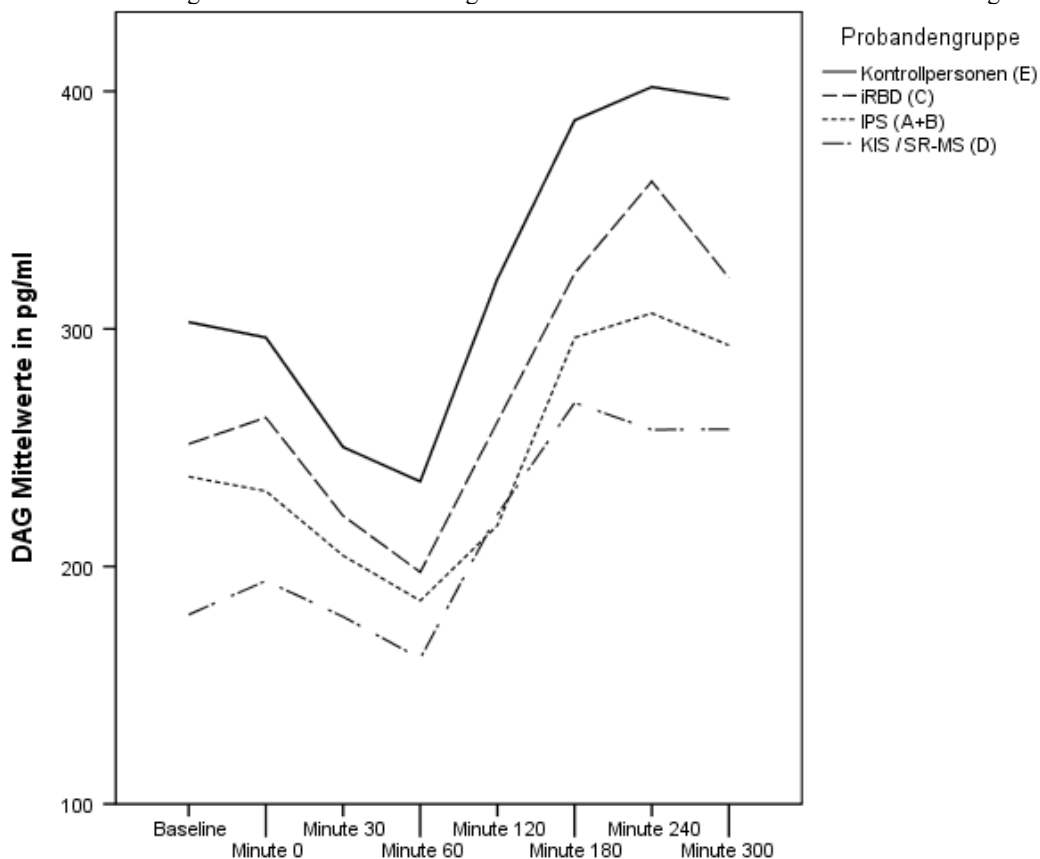


Abb. 6: Mittelwerte der desacetylierten Ghrelinform im Verlauf der Untersuchung. Die y-Achse entspricht der Serumkonzentration in pg/ml. Die x-Achse zeigt die 8 Zeitpunkte der Blutentnahmen. Zur besseren Veranschaulichung wurde für diese Abbildung ein identischer Zeitabstand der Blutentnahmen angenommen.

Abbildung 7 zeigt das Verhältnis von DAG zu AG im Verlauf der Untersuchung. Es verschiebt sich 1 Stunde nach Einnahme der Testmahlzeit bei allen Gruppen zu Gunsten von DAG und kehrt zur alten Relation nach weiteren 4 Stunden zurück. Zu Minute 60 zeigen Probanden der Gruppe iRBD (C) und IPS (A+B) gegenüber Kontrollpersonen (E) und Patienten mit MS (D) einen deskriptiv höheres DAG:AG-Verhältnis.

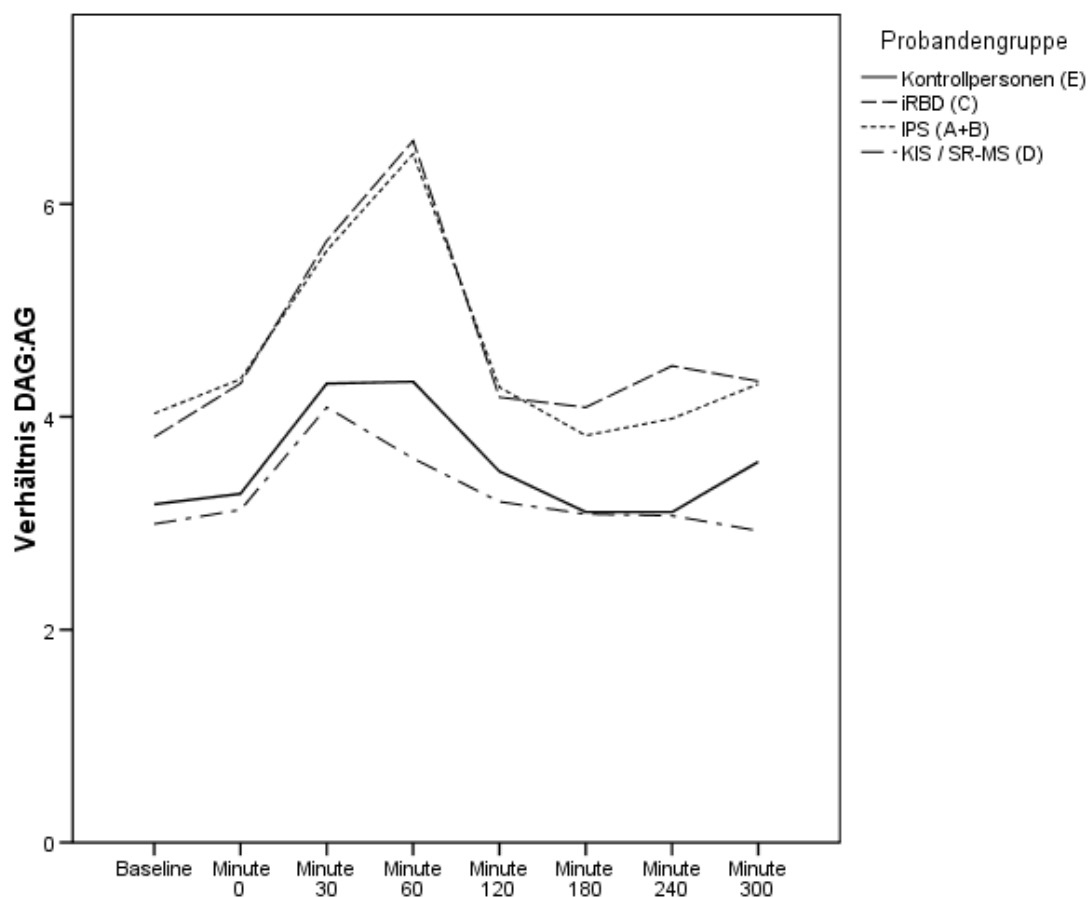


Abb. 7: Verhältnis der beiden Hormonformen im Verlauf der Untersuchung. Die y-Achse entspricht dem Quotienten desacetyliertem Ghrelin zu acetyliertem Ghrelin. Die x-Achse zeigt die 8 Zeitpunkte der Blutentnahmen. Zur besseren Veranschaulichung wurde für diese Abbildung ein identischer Zeitabstand der Blutentnahmen angenommen.

Abbildungen 8 bis 11 zeigen in der Boxplot-Darstellung die berechneten Flächen unter den Kurven. Der schwarze Strich entspricht dem Median, die Box den mittleren 50% der Daten und die Whiskers den mittleren 95% der Daten. Die schwarzen Kreise sind Werte, die außerhalb der mittleren 95% der Daten liegen. Man sieht anhand der Whiskers und der einzelnen Punkten die ausgeprägte interindividuelle Streuung der Werte.

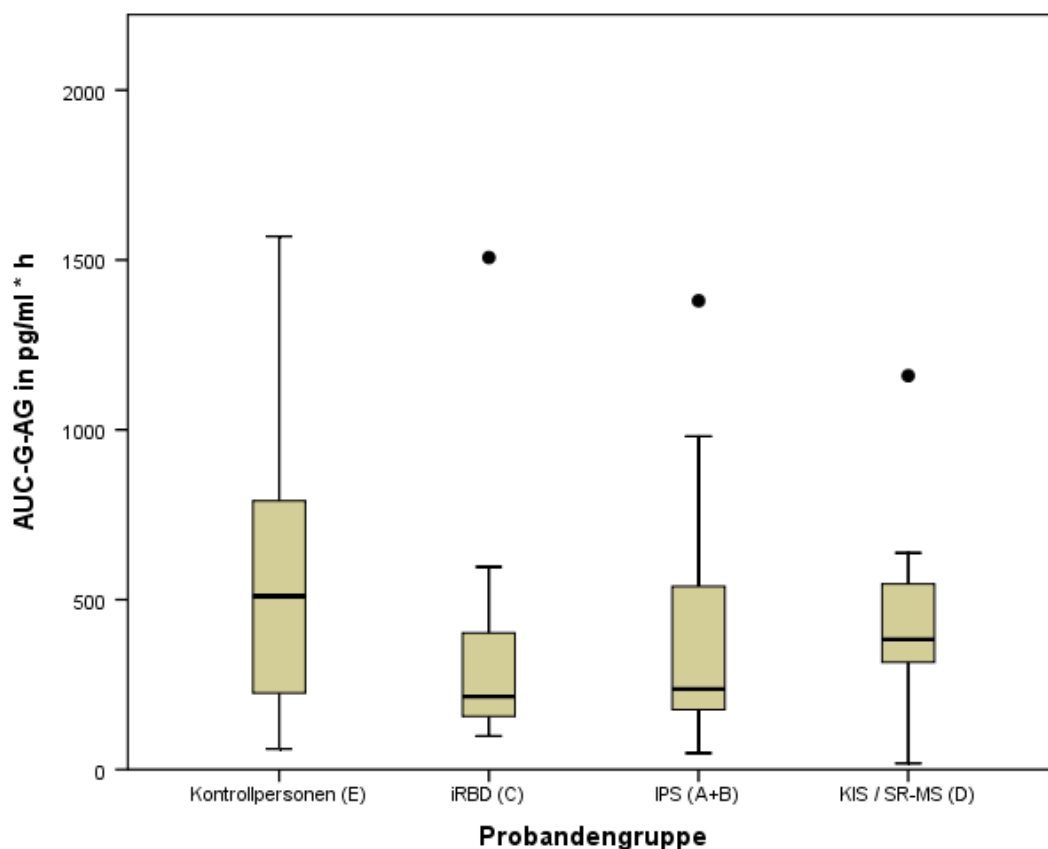


Abb. 8: Boxplot der kompletten Fläche unter der Kurve von acetyliertem Ghrelin. Die y-Achse entspricht der AUC-G: "area under the curve-ground" in pg/ml * h. Sie spiegelt die Gesamtkonzentration im Plasma während der Untersuchung wider. Schwarzer Strich: Median. Box: mittleren 50% der Daten. Whiskers: mittleren 95% der Daten. Schwarze Kreise: Probanden außerhalb der mittleren 95% der Daten.

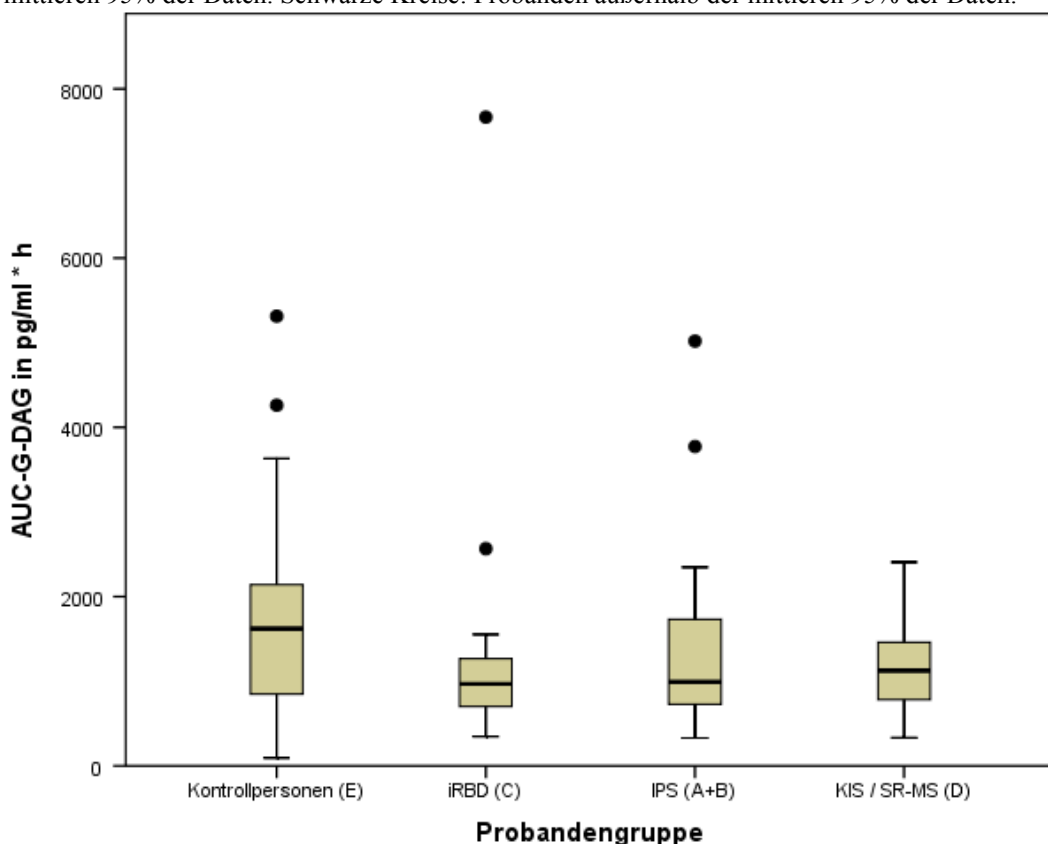


Abb. 9: Boxplot der kompletten Fläche unter der Kurve von desacetyliertem Ghrelin. Die y-Achse entspricht der AUC-G: "area under the curve-ground" in pg/ml * h. Sie spiegelt die Gesamtkonzentration im Plasma während der Untersuchung wider. Schwarzer Strich: Median. Box: mittleren 50% der Daten. Whiskers: mittleren 95% der Daten. Schwarze Kreise: Probanden außerhalb der mittleren 95% der Daten.

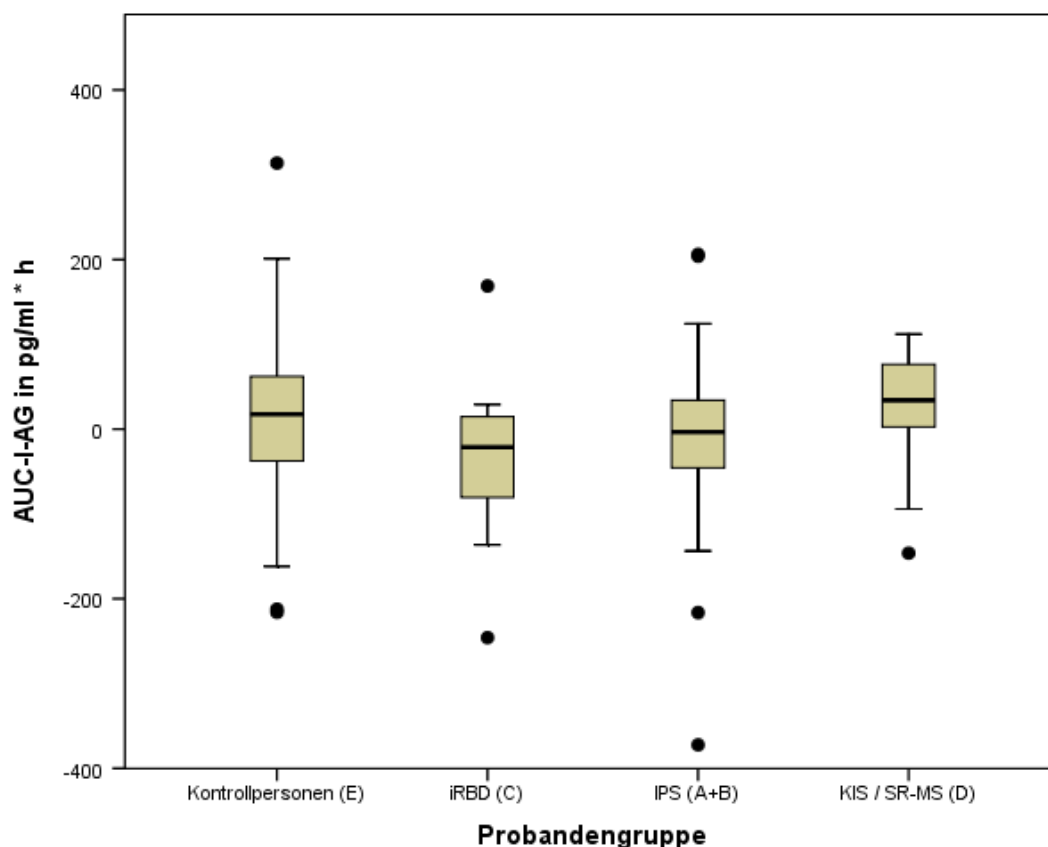


Abb. 10: Boxplot der dynamischen Fläche unter der Kurve von acetyliertem Ghrelin. Die y-Achse entspricht der AUC-I: "area under the curve-increase" in pg/ml * h. Sie spiegelt den Kurvenverlauf im Plasma während der Untersuchung wider. Schwarzer Strich: Median. Box: mittleren 50% der Daten. Whiskers: mittleren 95% der Daten. Schwarze Kreise: Probanden außerhalb der mittleren 95% der Daten.

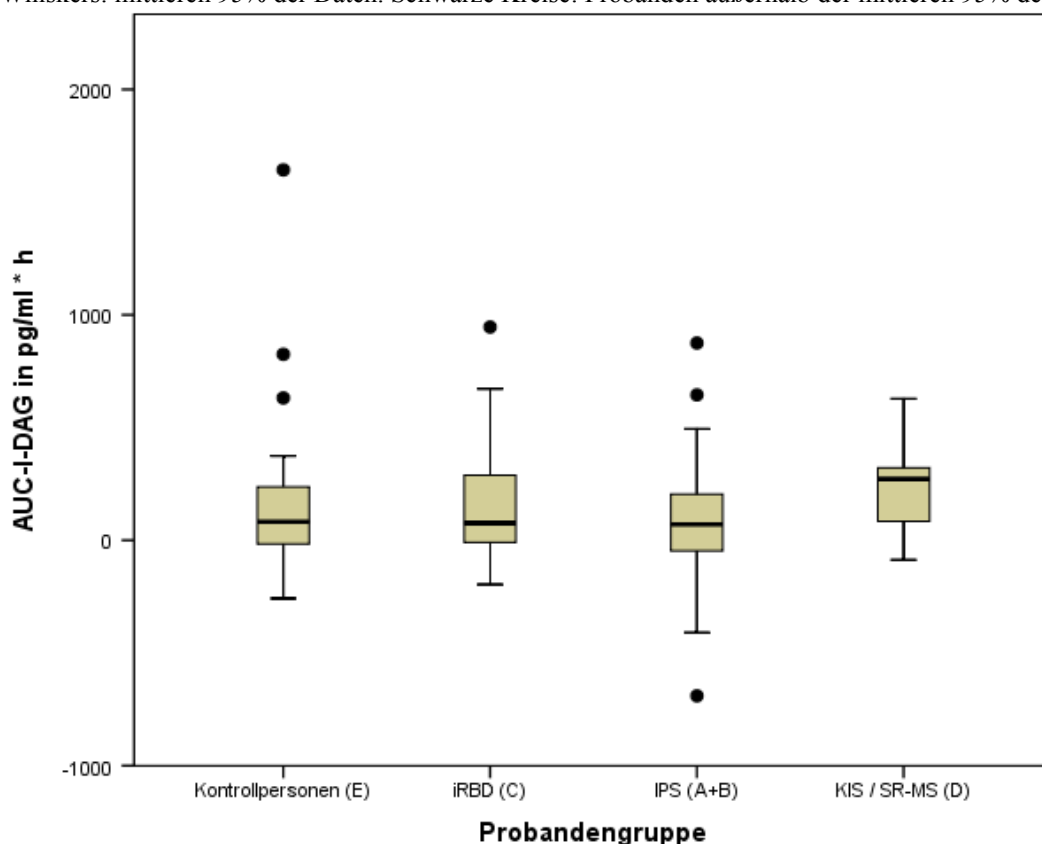


Abb. 11: Boxplot der dynamischen Fläche unter der Kurve von desacetyliertem Ghrelin. Die y-Achse entspricht der AUC-I: "area under the curve-increase" in pg/ml * h. Sie spiegelt den Kurvenverlauf im Plasma während der Untersuchung wider. Schwarzer Strich: Median. Box: mittleren 50% der Daten. Whiskers: mittleren 95% der Daten. Schwarze Kreise: Probanden außerhalb der mittleren 95% der Daten.

Tabelle 3 zeigt die berechneten und korrigierten (Alter, Geschlecht und BMI) p-Werte der drei durchgeführten Gruppenvergleiche der AUC, der Nüchternkonzentrationen beider Hormonunterformen sowie dem DAG:AG-Verhältnis. Für Letzteres wurde bei jedem Probanden der Mittelwert aller 8 Zeitpunkte verwendet. Mit Werten zwischen 0,08 und 1,00 erreichte kein Vergleich statistische Signifikanz.

Tabelle 4 zeigt die zugrunde liegenden Mittelwerte mit Standardabweichung sowie Maximum und Minimum der Flächen unter den Kurven, der Nüchternkonzentration beider Hormonunterformen sowie dem DAG:AG-Verhältnis. Die große Standardabweichung spiegelt eine hohe interindividuelle Streuung wider.

	Kontrollen (E) gegen iRBD (C)	Kontrollen (E) gegen IPS (A+B)	Kontrollen (E) gegen KIS / RR-MS (D)
Analysierte P-Werte			
AUC-G-AG	1,00	0,18	0,63
AUC-G-DAG	1,00	0,72	0,34
AUC-I-AG	0,25	0,72	0,69
AUC-I-DAG	1,00	0,32	0,90
AG - Nüchternkonzentration	1,00	0,25	0,18
DAG - Nüchternkonzentration	1,00	0,88	0,08
DAG:AG Verhältnis	1,00	0,73	0,09

Tabelle 3: Statistisch errechnete p-Werte (korrigiert für Alter, Geschlecht und BMI) der AUC, der AG- bzw. DAG-Nüchternkonzentrationen sowie des DAG:AG-Verhältnisses.

	IPS (A+B)	iRBD (C)	KIS / RR-MS (D)	Kontrollpersonen (E)
Mittelwerte, SD und Range				
AUC-G-AG	370 ± 303 [49-1380]	353 ± 359 [98-1507]	431 ± 256 [18-1159]	568 ± 408 [61-1570]
AUC-G-DAG	1305 ± 916 [329-5019]	1475 ± 1793 [347-7666]	1167 ± 523 [332-2407]	1735 ± 1257 [94-5313]
AUC-I-AG	-7,5 ± 98,5 [-372,3-206,1]	-32,6 ± 92,4 [-245,8-168,9]	24,1 ± 72,8 [-146,2-112,1]	12,1 ± 122,3 [-216-313,7]
AUC-I-DAG	76,7 ± 262,4 [-690-875]	174,9 ± 320,1 [-196-946,1]	238,5 ± 196,6 [-86,7-628,2]	170,2 ± 394,1 [-258,2-1643,2]
AG - Nüchternkonzentration	73,1 ± 59,5 [10,3-243]	74,6 ± 76,7 [18,7-301,8]	78,7 ± 55,6 [2,6-252,7]	107,6 ± 82,1 [11,4-327,9]
DAG - Nüchternkonzentration	237,8 ± 163,1 [32,6-846,7]	251,5 ± 300,4 [48-1300,5]	179,7 ± 81,1 [54,8-344,3]	302,9 ± 205,6 [14,8-778,9]
DAG:AG Verhältnis	4,6 ± 2 [1,9-9,3]	4,7 ± 1,7 [1,8-7,5]	5,4 ± 8,7 [0,7-37,1]	3,5 ± 1,9 [1,2-9,4]

Tabelle 4: Mittelwerte, Standardabweichungen und Range der berechneten AUC, AG- und DAG-Nüchternkonzentrationen sowie DAG-AG-Verhältnis. SD = standard deviation (Standardabweichung). Range (Bereich) = Minimaler und Maximaler Wert. Einheit AUC: pg/ml * h. Einheit Nüchternkonzentration: pg/ml

3.3 Ghrelinkonzentrationen zusätzlicher Parameter

Die Berechnung des Steigungs-Quotienten (Gesamtghrelin Minute 300 / Gesamtghrelin Minute 60) für den Vergleich mit der in Abschnitt 1.5.1 erwähnten Arbeit liegt für die iRBD-Gruppe (C) bei $1,84 \pm 0,75$ (Mittelwert \pm Standardabweichung), der der IPS-Gruppe (A+B) bei $1,74 \pm 0,52$ und bei den gesunden Kontrollen (E) bei $1,81 \pm 0,54$.

Abbildungen 12 und 13 zeigen die geschlechtsspezifischen Mittelwerte der beiden Unterformen AG und DAG. Frauen weisen gegenüber Männern zu allen Zeitpunkten höhere Ghrelinkonzentrationen auf.

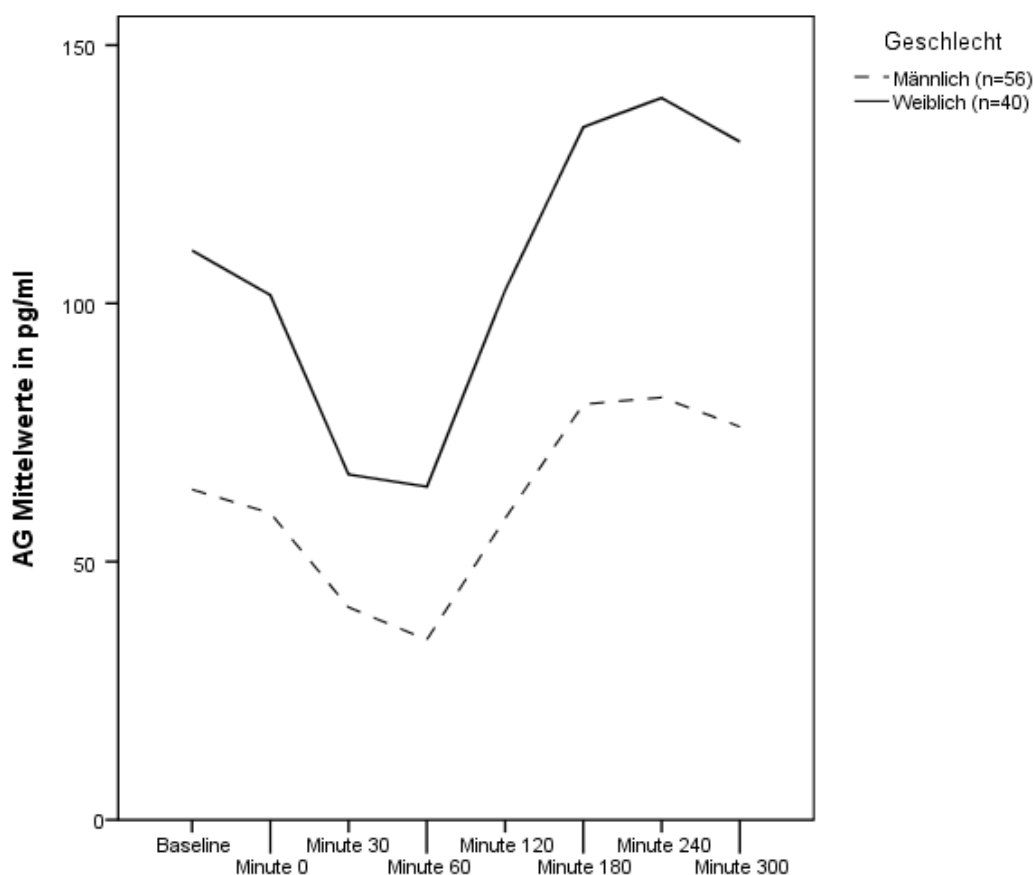


Abb. 12: Mittelwerte der acetylierten Ghrelinform von Frauen und Männern im Verlauf der Untersuchung. Die y-Achse entspricht der Serumkonzentration in pg/ml. Die x-Achse zeigt die 8 Zeitpunkte der Blutentnahmen. Zur besseren Veranschaulichung wurde für diese Abbildung ein identischer Zeitabstand der Blutentnahmen angenommen.

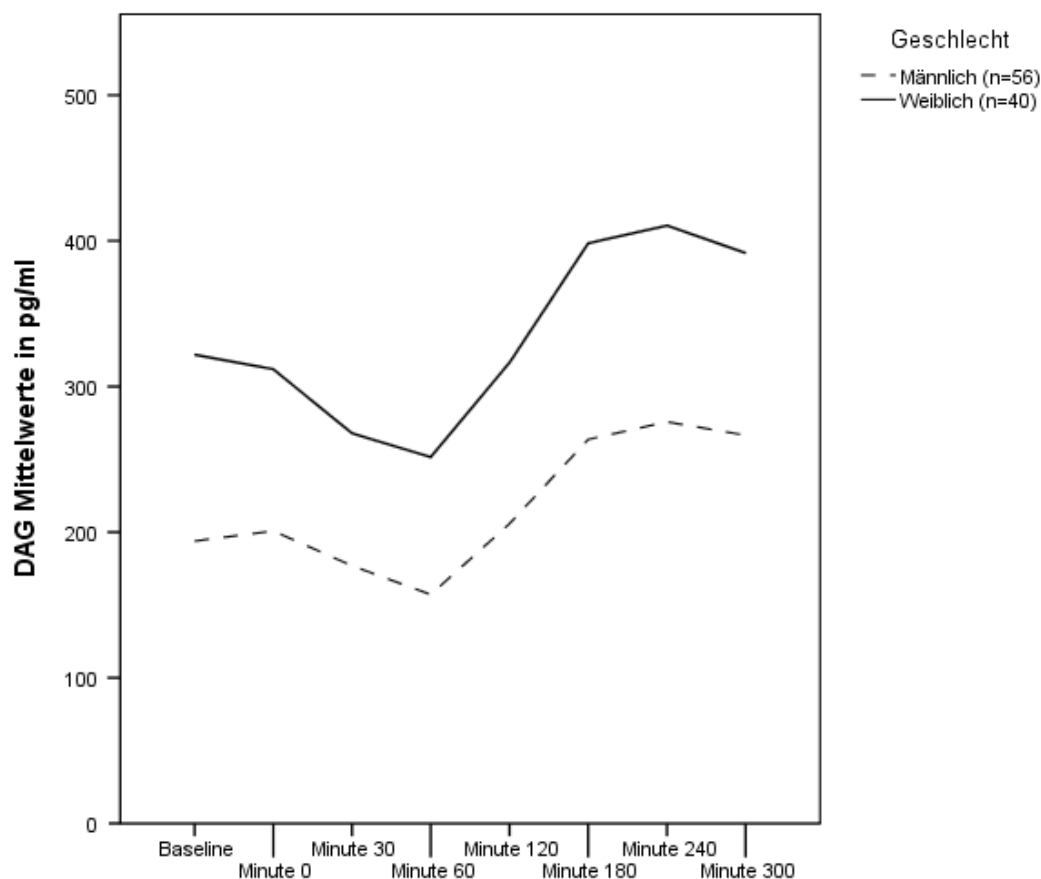


Abb. 13: Mittelwerte der desacetylierten Ghrelinform von Frauen und Männern im Verlauf der Untersuchung. Die y-Achse entspricht der Serumkonzentration in pg/ml. Die x-Achse zeigt die 8 Zeitpunkte der Blutentnahmen. Zur besseren Veranschaulichung wurde für diese Abbildung ein identischer Zeitabstand der Blutentnahmen angenommen.

Abbildungen 14 und 15 zeigen die Mittelwerte der Unterformen AG und DAG in drei definierten BMI-Bereichen nach den Kriterien der World Health Organisation. Die Ghrelinkonzentrationen korrelieren negativ mit steigendem BMI.

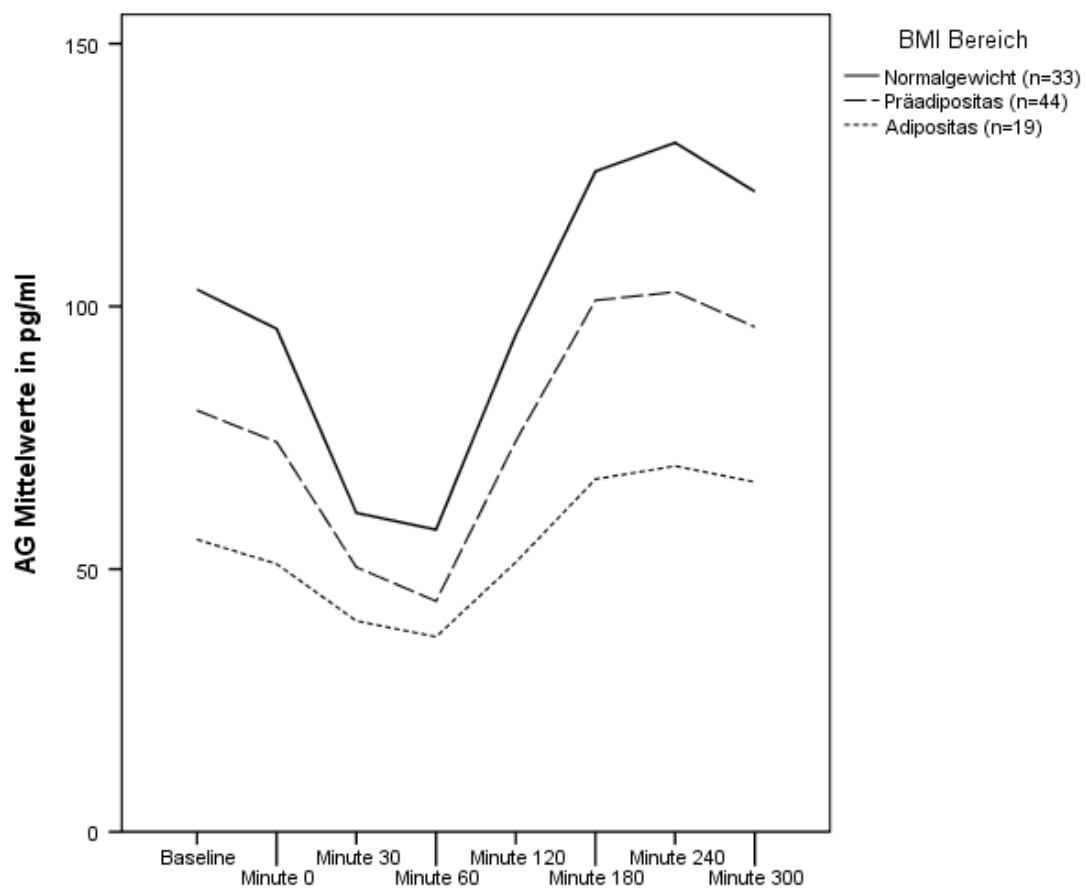


Abb. 14: Mittelwerte der acetylierten Ghrelinform verschiedener BMI Bereiche im Verlauf der Untersuchung. Die y-Achse entspricht der Serumkonzentration in pg/ml. Die x-Achse zeigt die 8 Zeitpunkte der Blutentnahmen. Zur besseren Veranschaulichung wurde für diese Abbildung ein identischer Zeitabstand der Blutentnahmen angenommen. Normalgewicht: BMI von <25 . Präadipositas: BMI von $>24,9$ und <30 . Adipositas: BMI >30

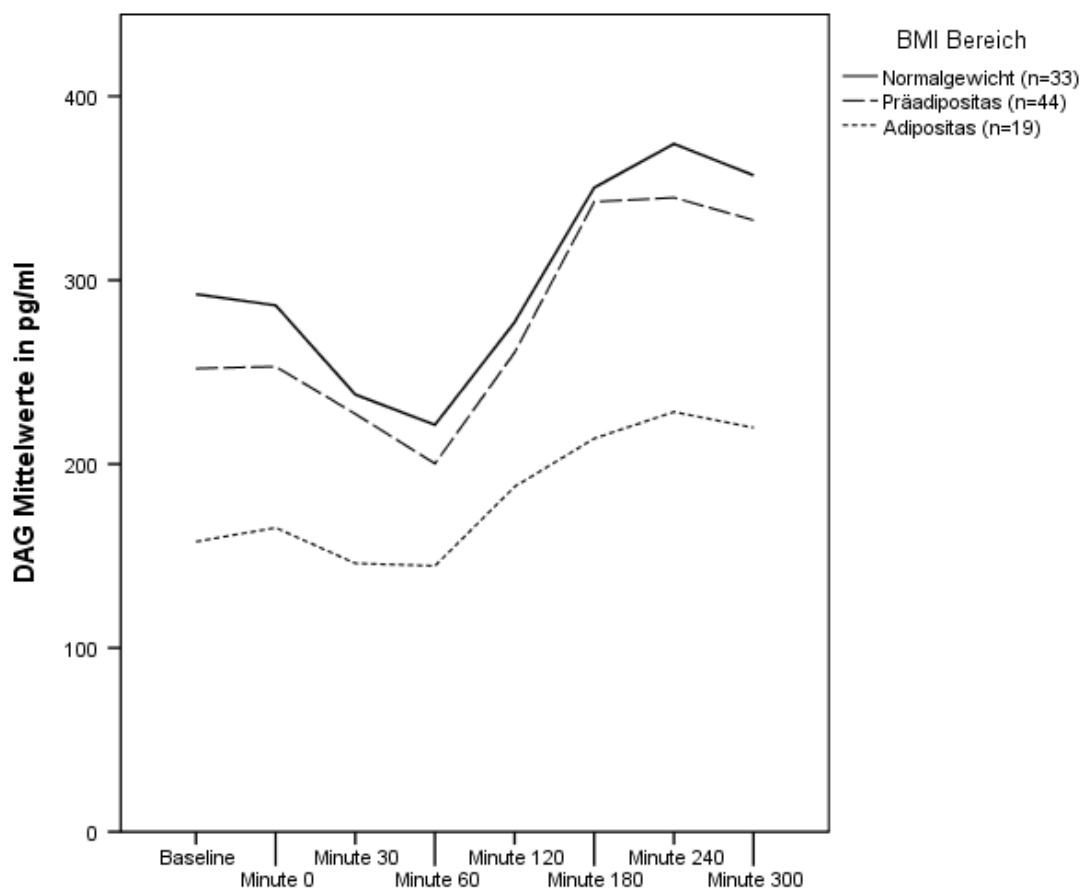


Abb. 15: Mittelwerte der desacetylierten Ghrelinform verschiedener BMI Bereiche im Verlauf der Untersuchung. Die y-Achse entspricht der Serumkonzentration in pg/ml. Die x-Achse zeigt die 8 Zeitpunkte der Blutentnahmen. Zur besseren Veranschaulichung wurde für diese Abbildung ein identischer Zeitabstand der Blutentnahmen angenommen. Normalgewicht: BMI von <25 . Präadipositas: BMI von $>24,9$ und <30 . Adipositas: BMI >30

Aufgrund der Geschlechtsheterogenität der Gruppen zeigen **Abbildungen 16 und 17** geschlechtskorrigierte Mittelwerte der jeweiligen Probandengruppen für die beiden Unterformen AG und DAG. Als Berechnungsgrundlage wurden bei Frauen 80% höhere Ghrelinkonzentrationen angenommen. Die AG- und DAG-Kurven der Patientengruppen nähern sich nach der Korrektur der Kontrollgruppenkurve an. Probandengruppe iRBD (C) zeigt nach der Korrektur teilweise höhere DAG-Konzentrationen gegenüber der Kontrollgruppe (E).

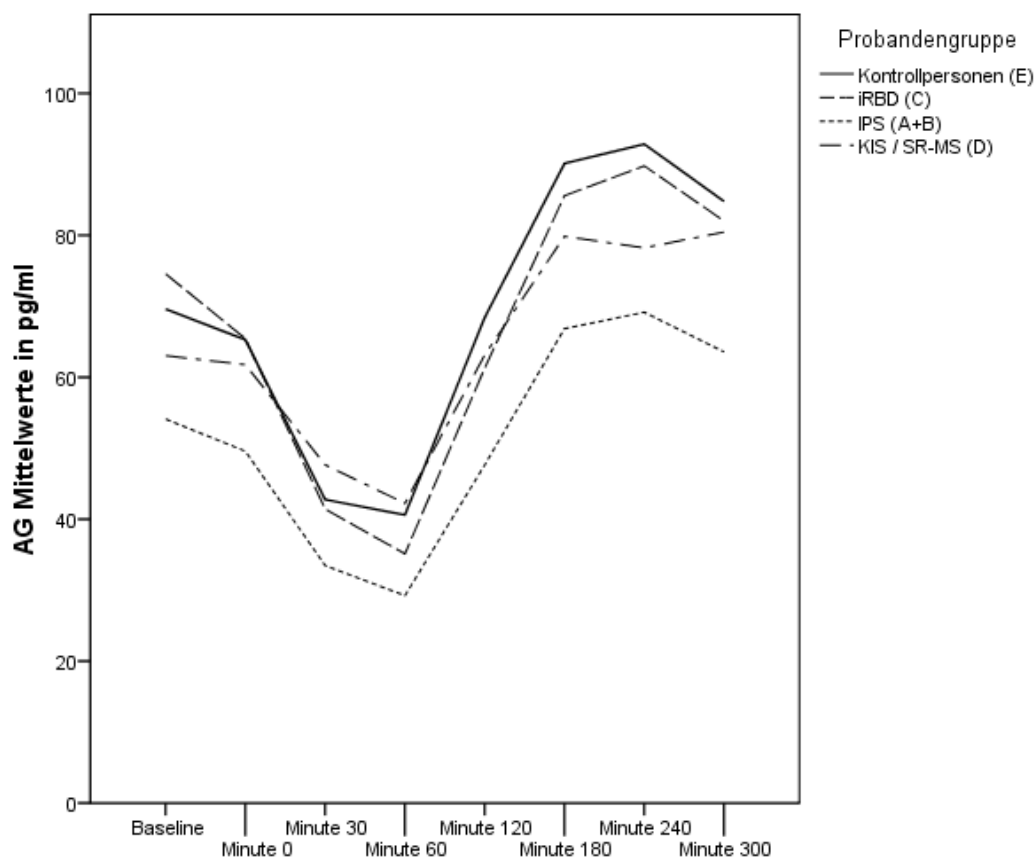


Abb. 16: Geschlechtskorrigierte Mittelwerte der acetylierten Ghrelinform im Verlauf der Untersuchung. Die y-Achse entspricht der Serumkonzentration in pg/ml. Die x-Achse zeigt die 8 Zeitpunkte der Blutentnahmen. Zur besseren Veranschaulichung wurde für diese Abbildung ein identischer Zeitabstand der Blutentnahmen angenommen.

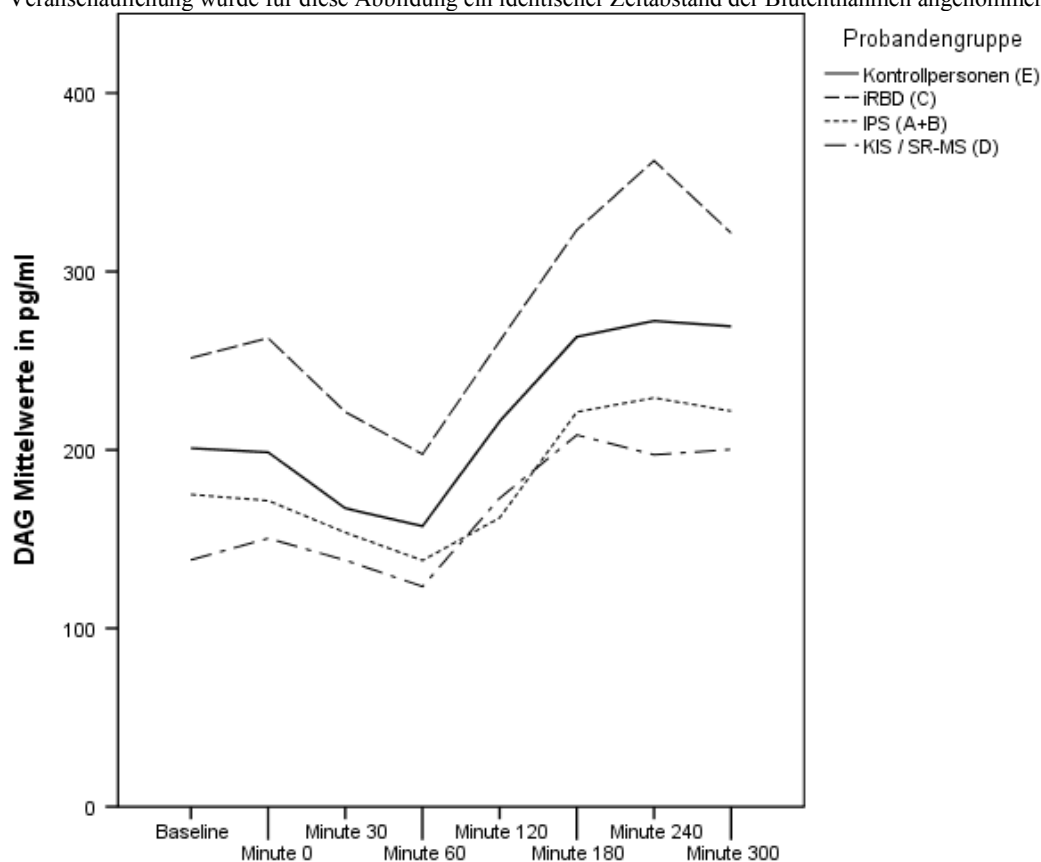


Abb. 17: Geschlechtskorrigierte Mittelwerte der desacetylierten Ghrelinform im Verlauf der Untersuchung. Die y-Achse entspricht der Serumkonzentration in pg/ml. Die x-Achse zeigt die 8 Zeitpunkte der Blutentnahmen. Zur besseren Veranschaulichung wurde für diese Abbildung ein identischer Zeitabstand der Blutentnahmen angenommen.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Ghrelinausschüttung bei Patienten mit REM-Schlafverhaltensstörung, idiopathischem Parkinsonsyndrom und Multipler Sklerose im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen untersucht. Es wurde vor und nach einer Testmahlzeit zu acht definierten Zeitpunkten die Plasmakonzentration von AG und DAG bestimmt. Die Flächen unter den Kurven, die AG- bzw. DAG-Nüchternkonzentrationen sowie das DAG:AG-Verhältnis wurden mit einer Analyse der Kovarianzen (ANCOVA) statistisch ausgewertet. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen nachgewiesen werden.

4.1 Diskussion der Methodik und des Probandenkollektivs

Verschiedene Faktoren des Untersuchungsablaufs sowie Eigenschaften des Probandenkollektivs haben einen Einfluss auf die gemessenen Ghrelinkonzentrationen. Im Folgenden wird diskutiert, inwieweit dadurch die vorliegenden Ergebnisse beeinflusst worden sind oder welche Faktoren durch das angewandte Studiendesign kontrolliert werden konnten.

Methodik:

Die Rhythmik der Ghrelinsekretion ist mit den individuellen Essgewohnheiten assoziiert (LeSauter et al. 2009). Der Untersuchungsstart zwischen 8 und 9 Uhr morgens wurde dem jeweiligen Probanden angepasst. Bei einer Abweichung von mehr als einer Stunde von dem gewählten Zeitpunkt wurde der Teilnehmer nicht eingeschlossen. Hätte man einen Probanden rekrutiert, welcher normalerweise erst um 12 Uhr die erste Mahlzeit zu sich nimmt, wäre möglicherweise die gemessene Nüchternkonzentration gegenüber anderen Teilnehmern zu niedrig. Somit konnte verhindert werden, dass ein potentieller Unterschied der Ghrelin-Nüchternkonzentrationen lediglich auf fehlender Standardisierung der individuellen Ghrelinrhythmik beruht.

Die Dehnung der Magenwand hat keinen Einfluss auf die Ghrelinausschüttung (Blom et al. 2006). Unabhängig vom bisher nicht vollständig geklärten postduodenalen Mechanismus der Ghrelinsuppression (Overduin 2004) korreliert die Ghrelinkonzentration mit dem Glucosespiegel im Blut (Shiia et al. 2002). Die Dauer der Einnahme der Testmahlzeit beeinflusst den Glucosespiegel durch frühzeitigen oder verzögerten Kontakt zwischen Nahrungsbestandteilen und resorbierendem Gewebe. Folglich ist ein vergleichbarer Zeitraum erforderlich. Alle Probanden haben die

Testmahlzeit in einem adäquaten Zeitraum eingenommen (Mittelwert: 7,8 Minuten. Standardabweichung: 2,2 Minuten. Gruppenspezifische Werte sind in Tabelle 2 abgebildet). Eine mögliche Verzerrung der gemessenen Ghrelinkonzentrationen durch verzögerte oder frühzeitige Glucoseresorption infolge unterschiedlicher Einnahmezeit der Testmahlzeit konnte somit minimiert werden.

Die 8 Blutentnahmen erfolgten aus einem intravenösen Zugang. Einige Probanden neigten zu Gerinnungsprozessen innerhalb des Plastikkanals mit konsekutiver Reduzierung des Durchmessers. Je kleiner der Kanülendurchmesser während einer Blutentnahme, desto ausgeprägter die Hämolyse. Peroxidasen aus zerfallenden Erythrozyten interferieren mit der im ELISA verwendeten Acetylcholinesterase. Andere Bestandteile hämolysierter roter Blutkörperchen behindern die Interaktion zwischen Antigen und Antikörper – ein essentieller Schritt des Auswertungsprozesses. Als Folge können die Ghrelinkonzentrationen bis zu einem Drittel niedriger als real vorliegend gemessen werden (Trivedi et al. 2012). Bei Probanden mit hoher Hämolysegefahr wurde der intravenöse Zugang mit 10 ml isotoner Kochsalzlösung gespült, 30 Sekunden gewartet und die anschließend abgenommene EDTA-Monovette verworfen. Bei weiterhin bestehender Hämolysegefahr wurde bei wenigen Teilnehmern ein neuer Zugang gelegt oder ein „Butterfly“ für Einzelentnahmen verwendet. Einige Probanden verweigerten dies und somit könnten teilweise zu niedrige Konzentrationen gemessen worden sein. Es ist nicht mehr konkret nachvollziehbar, in welcher Probandengruppe diese Problematik vermehrt auftrat. Falls die Kontrollgruppe hauptsächlich betroffen war, wäre eine hypothetisch reduzierte Ghrelinsekretion bei Patienten mit iRBD und IPS schwerer nachzuweisen gewesen.

Hormone werden im Plasma durch endogene Enzyme abgebaut. Bei endokrinologischen Studien stellt die Verarbeitung der Blutproben somit einen kritischen präanalytischen Schritt dar. AG wird rasch von Esterasen angegriffen und das gemessene DAG:AG-Verhältnis variiert je nach Verarbeitungsprozess. Um möglichst physiologische Werte zu erhalten, sollte jede Probe rasch die folgenden 5 Schritte durchlaufen: Abkühlung, Verdünnung, Ansäuerung, Proteaseninhibition und chromatographische Auftrennung (Stengel et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit diente PHMB als Proteaseninhibitor. In der Zentrifuge wurde die Probe langsam abgekühlt. Die Ansäuerung erfolgte frühestens 15 Minuten nach Entnahme. Eine Verdünnung oder chromatographische Auftrennung wurde nicht durchgeführt. Zwar war der Prozess der Blutverarbeitung bei allen Probandengruppen identisch, jedoch ist von einer prozentual höheren AG-Degradation bei Proben mit besonders hohen AG-

Konzentrationen gegenüber Proben mit niedrigen AG-Konzentrationen auszugehen: Mit steigender Substratmenge steigt die Reaktionsgeschwindigkeit der Esterspaltung. Die dafür zugrunde gelegte Michaelis-Menten-Theorie (Johnson et al. 2011) setzt voraus, dass Esterasen im Blut nicht allosterisch moduliert werden (keine Quelle in der Literatur auffindbar). Als Konsequenz könnte ein möglicher Unterschied der AG-Konzentrationen im Gruppenvergleich abgeschwächt worden sein.

Ebenso wichtig ist das Auswertungsverfahren im Anschluss an die Probenverarbeitung. In den meisten bisher publizierten Studien wurde Ghrelin mit einem RIA gemessen. Diese detektieren entweder nur AG oder die Ghrelingesamtkonzentration. Sie erkennen lediglich ein Epitop, binden an inaktive Ghrelinfragmente und verfälschen somit die physiologischen Werte (Prudom et al. 2010). Durch Entdeckung der GOAT und der Erkenntnis, dass DAG mehr Funktionen im Körper ausübt als bisher gedacht, ist das DAG:AG-Verhältnis ein wichtiger Parameter. Folglich sollten beide Hormonunterformen separat gemessen werden. Je nach Assay-Hersteller zeigen sich bei der Auswertung verschiedene Ergebnisse. Beim gleichen Assay-Hersteller zeigen sich je nach auswertendem Labor verschiedene Ergebnisse. Dies ist unter anderem ein mögliches Resultat der variierenden Blutverarbeitung, wie im Absatz weiter oben beschrieben. Dies mag zwar für eine Studie mit Kontrollgruppe keine bedeutende Rolle spielen, aber eine internationale Vergleichbarkeit ist nicht gegeben. Weiterhin variieren die verschiedenen Ghrelin-Assays in ihrer Spezifität. Im Vergleich von AG-Proben von Anorexia nervosa Patienten zu Kontrollpersonen zeigten sich je nach verwendetem Assay erniedrigte, erhöhte oder vergleichbare Werte (Liu et al. 2008; Kosowicz et al. 2011). Wenn man wissenschaftliche Datenbanken nach Ghrelin durchsucht, fällt auf, dass sich viele Arbeiten widersprechen. Dies könnte eine Folge der unterschiedlichen Spezifität der verschiedenen Ghrelin-Assays darstellen. Der in dieser Arbeit verwendete ELISA konnte AG und DAG separat messen und bindet nicht kreuzreaktiv an andere Peptide. Die Spezifität auf die jeweilige Hormonunterform wird vom Hersteller mit 100% angegeben, die zu strukturell ähnlichen Molekülen beträgt <0,06%. Im Gegensatz zu anderen Proteaseninhibitoren beeinflusst das verwendete PHMB keine chemische Reaktion und verfälscht somit keine Ergebnisse (Trivedi et al. 2012).

Der folgende Abschnitt befasst sich mit den zahlreichen Faktoren, welche die Ghrelinkonzentration im Blut beeinflussen können. Tabelle 1 in Abschnitt 1.1.2 hat bereits einige zusammengefasst. Mögliche Störgrößen müssen kontrolliert werden, um überhaupt eine veränderte Ghrelinsekretion festzustellen und um diese im zweiten Schritt auf die Erkrankung zurückführen zu können. Für die Faktoren Alter, BMI und

Geschlecht wurde statistisch korrigiert. Mögliche *Helicobacter pylori* Infektionen, beginnende Insulinresistenz und ein bisher unbekannter Bluthochdruck der Probanden konnten mit dem Studiendesign nicht eindeutig aufgedeckt werden. Schilddrüsenfunktionsstörungen, ein manifester Diabetes mellitus sowie Operationen am Magendarmtrakt wurden zwar anamnestisch erfragt, allerdings wäre gerade Ersteres oder ein sich entwickelnder Diabetes mellitus nur laborchemisch sicher auszuschließen. Weiterhin reduziert akut physischer Stress (im Sinne einer Infektion) die Ghrelinausschüttung. Erhöhte Konzentrationen zeigen sich unter Kälteexposition als metabolischen Stressor sowie psychologischem Stress (Stengel et al. 2011). Es ist daher möglich, dass allein die Tatsache, an einer Studie teilzunehmen, die Werte verändert hat. Ghrelin zirkuliert entweder frei im Blut oder ist an Lipoproteine gebunden (Holmes et al. 2009). Die beiden Hormonunterformen zeigen ein unterschiedliches Bindungsmuster. Als Ursache wird (analog zu der Bindung an den GRLN-R) die Veresterung an der dritten Aminosäure Serin des AG (siehe Abschnitt 1.1.1) angenommen. Unter normalen metabolischen Bedingungen sind im Blut 75% des AG an Lipoproteine gebunden (ungefähr 25% an „very low density lipoproteins“, 25% „low density lipoproteins“, 25% an „high density lipoproteins“) und 25% liegen als freies Plasmaprotein vor. Im Vergleich dazu bindet DAG zu ca. 50% an „high density lipoproteins“ und zirkuliert zu ca. 50% als freie Form. Die Bindungsfähigkeit von DAG an andere Lipoproteine ist mit <3% gering. Störungen im Fettstoffwechsel können mit Veränderungen der Lipoproteine und infolgedessen auch deren Bindungskapazitäten einhergehen. Der individuelle Lipoproteinstatus beeinflusst die freie und somit mit dem ELISA messbare Ghrelinkonzentration und wurde in der vorliegenden Arbeit nicht kontrolliert.

Zusammengefasst ist nicht sicher auszuschließen, dass alle erwähnten Punkte für die ausgeprägte interindividuelle Streuung der Ghrelinkonzentrationen verantwortlich sind.

Probandenkollektiv:

Die Probandengruppen mit IPS ohne Therapie (A) und therapiertem IPS (B) wurden separat rekrutiert, um eine mögliche Beeinflussung der Ghrelinsekretion durch eine dopaminerge Medikation festzustellen. Aufgrund ähnlicher Ghrelinkonzentrationen zu allen Zeitpunkten wurden beide Gruppen für die Auswertung zusammengefasst, um die Anzahl der Gruppenvergleiche zu minimieren.

Die Probandengruppe iRBD (C) lag mit 15 untersuchten Personen unterhalb der berechneten Stichprobengröße von 23. Unter der Hypothese, dass iRBD eine Vorstufe von IPS darstellt (Gagnon et al. 2006), ist es unwahrscheinlich, dass durch die geringe

Probandenanzahl ein Unterschied nicht entdeckt werden konnte, da sich auch in der ausreichend rekrutierten Gruppe des IPS (A+B) kein statistisch signifikanter Unterschied zeigte.

Alter, BMI und Geschlecht bewirken eine unterschiedliche Ghrelinausschüttung (Akamizu 2004; Moss et al. 2012). Die Probandengruppen iRBD, IPS und Kontrollen zeigen ein ähnliches Alter. Der BMI-Wert ist in allen Gruppen vergleichbar. **Abbildungen 14 und 15** bestätigen, dass auch in der vorliegenden Arbeit eine negative Korrelation von BMI und den Ghrelinkonzentrationen vorliegt. Die epidemiologische Männerdominanz der Erkrankungen RBD und IPS spiegelt sich auch in den jeweiligen Gruppen wider. Häufig wurden Ehepartner als Kontrollpersonen rekrutiert, demzufolge zeigt die Kontrollgruppe eine hohe weibliche Quote. Auf Grund tendenziell höherer Ghrelinkonzentrationen bei Frauen und niedrigeren bei Männern sowie der Annahme, dass Patienten mit IPS und iRBD durch den hypothetischen vagalen Schaden folglich eher niedrigere Ghrelinkonzentrationen aufweisen, wäre ein tatsächlicher Unterschied in den Mittelwerten und somit Grafiken leichter nachweisbar gewesen. **Abbildungen 12 und 13** bestätigen, dass Frauen auch in der vorliegenden Arbeit tendenziell höhere AG sowie DAG Werte besitzen.

Wegen der oben beschriebenen Heterogenität der Gruppen wurde bei der Auswertung für die Faktoren Alter, BMI und Geschlecht korrigiert.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Es gibt bislang nur eine Arbeit, die die Ghrelinausschüttung bei Patienten mit IPS und iRBD untersucht hat (Unger et al. 2011). Dort konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden: Patienten mit iRBD und IPS zeigten nach einer Testmahlzeit einen reduzierten Ghrelinanstieg in der späten postprandialen Phase 60 Minuten nach Einnahme der Testmahlzeit. Nach optischer Betrachtung der Mittelwertkurven bildeten die Autoren einen Steigungs-Quotienten (Gesamtghrelin Minute 300 / Gesamtghrelin Minute 60) zur statistischen Auswertung. In der vorliegenden Arbeit liegt dieser Quotient der iRBD-Gruppe (C) bei $1,84 \pm 0,75$ (Mittelwert \pm Standardabweichung), der der IPS-Gruppe (A+B) bei $1,74 \pm 0,52$ und bei den gesunden Kontrollen (E) bei $1,81 \pm 0,54$. Es lässt sich durch Betrachtung dieser Werte sowie der Mittelwertkurven (**siehe Abbildung 5 und 6**) auf einen nahezu identischen Wiederanstieg nach der Testmahlzeit schließen. Außerdem hätte sich ein reduzierter postprandialer Wiederanstieg am ehesten in der dynamischen Fläche AUC-I (siehe Abschnitt 2.3) widerspiegelt. Diese zeigt

jedoch in der Analyse keine Differenz. Der Unterschied konnte somit nicht reproduziert werden.

Eine Übereinstimmung zeigte sich darin, dass die Mittelwerte sowie die AUC von Patienten mit iRBD und IPS im Vergleich zu Kontrollpersonen deskriptiv etwas niedrigere Werte aufweisen, wobei nicht ganz sicher auszuschließen ist, dass der Unterschied in dieser Arbeit auf der Geschlechtsheterogenität der Gruppen oder anderen Faktoren die Ghrelin beeinflussen (siehe Abschnitt 4.1) beruht. Die vorliegenden Ergebnisse (**siehe Abbildungen 12 und 13**) und eine weitere Studie (Akamizu 2004) zeigen, dass Frauen gegenüber Männern ca. 80% höhere Ghrelinkonzentrationen aufweisen. Korrigiert man für das Geschlecht nähern sich die Mittelwertskurven an und die oben beschriebenen deskriptiv etwas niedrigeren Werte sind nicht mehr deutlich nachzuweisen (**siehe Abbildungen 16 und 17**).

Es stellt sich die Frage, warum die reduzierte späte postprandiale Ghrelinsekretion nicht reproduziert werden konnte. Entweder haben die pathognomonischen Einschlusskörperchen in den Strukturen des N. vagus (siehe Abschnitt 1.2.2) keinen Einfluss auf die Ghrelinausschüttung oder der N. vagus ist generell nicht an der späten postprandialen Ghrelinsekretion beteiligt. Der folgende Abschnitt behandelt den aktuellen wissenschaftlichen Stand des N. vagus bezüglich der Ghrelinsekretion:

Für eine prinzipielle Beteiligung spricht die Tatsache, dass eine elektronische Reizung des N. vagus zu höheren Ghrelinplasmawerten führt (Gil et al. 2011). Experimentelle Modulation der postganglionären Übertragung des N. vagus (Neurotransmitter: Acetylcholin) verändern die Ghrelinkonzentrationen im Blut: Ein Cholinesterase-Hemmer erhöht Ghrelin im Blut, Blockierung von muskarinergen (vornehmlich Typ 1) Acetylcholinrezeptoren reduziert es (Broglia 2004). Es scheint unwahrscheinlich, dass Vagusefferenzen direkt an Ghrelinzellen am Ausschüttungsmechanismus beteiligt sind, da Acetylcholin im Zellexperiment zu keiner erhöhten Sekretion führte (de la Cour et al. 2007). Es muss also von einem indirekten Mechanismus ausgegangen werden.

Der Verdauungsprozess kann vereinfacht in drei aufeinanderfolgende Abschnitte eingeteilt werden: cephalische, gastrische und intestinale Phase. In der cephalischen Phase wird durch Sehen, Riechen, Schmecken oder Gedanken an Nahrung der N. vagus gereizt. Dieser soll den Körper unter anderem durch Ausschüttung von gastrointestinalen Hormonen auf die erwartete Nahrungsaufnahme und die damit resultierenden metabolischen Veränderungen vorbereiten. In der cephalischen Phase steigt neben dem pankreatischen Polypeptid (PP) – Marker für den Tonus der vagalen Efferenzen – ebenfalls Ghrelin an (Simonian et al. 2005).

Bisher wurde in drei Arbeiten die Ghrelinausschüttung bei Ratten mit operativ durchtrenntem N. vagus untersucht. Williams und Kollegen konnten durch ihr Experiment an vagotomierten Ratten eine Woche nach der Operation feststellen, dass der N. vagus bei der Basisausschüttung und dem postprandialen Abfall nicht beteiligt zu sein scheint, wohingegen eine Relevanz für einen Anstieg bei 48 Stunden Nahrungskarenz postuliert wurde (Williams 2003). In der zweiten Arbeit konnten sich die Ratten mit 14 Tagen doppelt so lange von der Operation erholen, wobei anschließend nur präprandiale Ghrelinkonzentrationen gemessen wurden. Gesamtghrelin sowie das DAG:AG-Verhältnis zeigten sich unverändert (Erlanson-Albertsson et al. 2008). Im Gegensatz dazu konnten in der dritten Arbeit sogar dreifach höhere Ghrelinkonzentrationen nach Vagotomie gemessen werden (Lee et al. 2002).

Der bisherige Wissensstand zeigt, dass der N. vagus über einen indirekten Mechanismus für den Wiederanstieg nach einer Mahlzeit verantwortlich zu sein scheint. Entweder ist damit der letzte Abschnitt kurz vor der Nahrungsaufnahme, also im Sinne der cephalischen Phase, oder der komplette Anstieg während der Nahrungskarenz gemeint. Für eine Beteiligung an der cephalischen Phase gibt es gute Evidenz, die eine Übertragung auf den Menschen ermöglicht (Arosio 2004; Simonian et al. 2005; Power et al. 2008). Gegen eine Beteiligung des N. vagus an der kompletten präprandialen Phase spricht folgendes Beispiel: Wenn man nach Williams und Kollegen eine reduzierte Steigung über einen Zeitraum von 48 Stunden annimmt (Williams 2003), müssten vorzeitige Blutentnahmen eine verminderte Ghrelinkonzentration gegenüber Nicht-Vagotomierten ergeben. Dies konnte (wie schon im Abschnitt weiter oben beschrieben) im Tierexperiment mit Blutentnahmen nach kurzer Nahrungskarenz (<16 Stunden) nicht nachgewiesen werden (Lee et al. 2002; Erlanson-Albertsson et al. 2008) [In der Arbeit von Erlanson-Albertsson und Kollegen konnte die Dauer der Nahrungskarenz nicht aus dem Artikel ermittelt werden und wurde von den Autoren per E-Mail erfragt]. Unger und Kollegen haben in ihrer Arbeit vermutet, dass Lewy-Körper und Lewy Neuriten in Kerngebieten des N. vagus (siehe Abschnitt 1.2.2) dessen Funktion und infolgedessen die Ghrelinsekretion einschränkt (Unger et al. 2011). Erneut angenommen, dass der N. vagus für die komplette präprandiale Steigung verantwortlich sei, hätte dessen Beeinträchtigung bei vorzeitigen Blutentnahmen niedrigere Ghrelinkonzentrationen gegenüber gesunden Kontrollen ergeben müssen. Auch hier zeigte sich beim Menschen kein Unterschied nach einer kurzen Nahrungskarenz (<12 Stunden).

Zusammengefasst besteht die meiste Evidenz für eine Beteiligung des N. vagus an der cephalischen Phase kurz vor Nahrungsaufnahme. Mit dem derzeitigen Verständnis kann für kein Studienergebnis klar argumentiert werden. Die Rolle des N. vagus an der Ghrelinsekretion ist letztlich nicht vollständig verstanden. Es fehlt an weiteren tierexperimentellen Studien und vor allem an Studien, die eine Übertragbarkeit auf den Menschen ermöglichen.

Wie bisher erläutert, konnte hinsichtlich Ghrelin bei Patienten mit iRBD und IPS gegenüber gesunden Kontrollpersonen quantitativ in Form der AUC bzw. Nüchternkonzentration kein Unterschied festgestellt werden. Da sich das DAG:AG-Verhältnis aus diesen nicht signifikanten Daten ableitet, ist es nicht verwunderlich, dass sich keine der drei untersuchten Erkrankung hinsichtlich dieses Verhältnisses von gesunden Kontrollpersonen unterscheidet. Dies steht im Einklang mit unverändertem DAG:AG-Verhältnis nach Vagotomie im Tiermodell (Erlanson-Albertsson et al. 2008).

Der N. vagus ist nicht der einzige Nerv, mit dessen Schaden eine veränderte Ghrelinkonzentration anzunehmen ist. Wie bereits in der Einleitung erwähnt (siehe Abschnitt 1.2.5), lassen sich schon in frühen Stadien des IPS im Plexus submucosus und myentericus des enterischen Nervensystems pathognomonische Lewy-Körper und Lewy-Neuriten nachweisen (Beach et al. 2010). Diese könnten auf zwei Wegen die Ghrelinsekretion beeinflussen. Zum einen ist eine direkt topographische Beeinträchtigung der Ausschüttung vorstellbar. Ghrelin wird zum großen Teil in der Magenschleimhaut gebildet und liegt somit unmittelbar zwischen den α -Synukleinaggregaten. Es gibt keine Arbeit, die diesen expliziten Zusammenhang untersucht hat. Alternativ könnten gastrointestinale Hormone indirekt die Ausschüttung beeinflussen. Eine durch die α -Synukleinaggregate eingeschränkte Sekretionsfähigkeit des Plexus submucosus könnte die Konzentration der gastrointestinalen Hormone „glukoseabhängiges insulintropes Peptid“ (GIP) und Cholecystokin (CCK) verändern (wurde bisher in keiner Studie explizit untersucht). Die postprandiale Ghrelinkonzentration korreliert mit GIP und CCK und könnte somit konsekutiv ebenfalls verändert sein (Blom et al. 2006).

Eine Arbeitsgruppe aus der Türkei hat bei Patienten mit SR-MS und SP-MS gegenüber Kontrollpersonen doppelt so hohe Ghrelinkonzentrationen gemessen (Berilgen et al. 2005). In der hier vorliegenden Studie konnte dies nicht bestätigt werden. Das

Patientenkollektiv in der Arbeit von Berilgen und Kollegen bestand zu ca. 78% aus Frauen, wohingegen in der Kontrollgruppe nur jeder zweite Untersuchte weiblichen Geschlechts war. Frauen haben gegenüber Männern höhere Ghrelinspiegel (Akamizu 2004), ein möglicher Erklärungsansatz für die hohen gemessenen Werte in der Patientengruppe. In der vorliegenden Arbeit orientierte sich das Alter der Kontrollgruppe an den Erkrankungsbildern iRBD und IPS und ist somit deutlich zu hoch für den Vergleich an KIS / SR-MS. Auch wenn für das Alter statistisch korrigiert wurde, wäre eine adäquate Kontrollgruppe für eine bessere Vergleichbarkeit erforderlich gewesen. Als zusätzliches Argument gegen eine veränderte Ghrelinsekretion bei Patienten mit MS spricht das Ergebnis einer aktuellen Arbeit aus Deutschland. Es wurden Einzelnukleotid-Polymorphismen des Ghrelin- und Ghrelinrezeptorgens analysiert und man stellte keinen Unterschied gegenüber Kontrollpersonen fest (Rey et al. 2011). Ob ein Einzelnukleotid-Polymorphismus überhaupt Einfluss auf die Ghrelinsekretion hätte, ist wissenschaftlich nicht nachgewiesen.

Durch den Mangel an wissenschaftlichen Arbeiten über den Zusammenhang zwischen Ghrelin und MS ist es schwer für oder gegen ein Ergebnis zu argumentieren. Deshalb ist folgende Hypothese kritisch zu betrachten: MS ist eine chronische entzündliche Erkrankung des ZNS. Entzündungen setzen den Körper unter physischen Stress und dieser Zustand ist eher mit niedrigen Ghrelinspiegeln assoziiert (Stengel et al. 2011). Zusammengefasst scheinen sich Patienten mit MS bezüglich prä- und postprandialer Ghrelinausschüttung nicht von gesunden Kontrollpersonen zu unterscheiden.

4.3 Schlussfolgerung

In der Zielsetzung der Arbeit (siehe Abschnitt 1.6) wurde eine mögliche Relevanz zwischen Ghrelin und den Erkrankungsbildern angesprochen. Im Folgenden soll darauf eingegangen werden:

Verständnis der Pathophysiologie der Erkrankungsbilder:

Eine beeinträchtigte Ghrelinsekretion infolge einer Affektion des N. vagus in schon frühen Stadien des IPS konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. In Zusammenschau der ersten publizierten Studie über Ghrelin bei IPS und iRBD (Unger et al. 2011) und den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben sich mit deskriptiv niedrigeren Werten in beiden Studien jedoch weiterhin Hinweise auf eine mögliche Störung der neuroendokrinen Achse. Mit dem angewandten Studiendesign ist nicht ganz sicher auszuschließen, dass der Unterschied in dieser Arbeit lediglich auf der

Geschlechtsheterogenität der Gruppen oder anderen Störgrößen (siehe Abschnitt 4.1) beruht. Letzteres muss in weiteren Arbeiten geklärt werden, damit man auf kausale Zusammenhänge (α -Synukleinaggregate im enterischen Nervensystem oder N. vagus beeinflussen die Ghrelinsekretion) schließen kann.

Eine Erhöhung von Ghrelin als Kompensationsmechanismus der inflammatorischen Reaktion im ZNS bei Patienten mit MS konnte ebenfalls nicht bestätigt werden.

Ghrelin als Biomarker:

Aufgrund der hohen interindividuellen Variabilität eignet sich Ghrelin bisher nicht als Biomarker für Patienten mit iRBD, IPS oder Multiple Sklerose. Auch hier bleibt die Frage offen, ob die hohe interindividuelle Variabilität auf mangelnde Störgrößenkontrolle zurückzuführen ist (siehe Abschnitt 4.1).

Ghrelin als mögliches Therapeutikum:

Drei Jahre nach der Entdeckung Ghrelins wurde festgestellt, dass AG und DAG Kardiomyozyten schützen können (Baldanzi 2002). Einige Jahre später wurde der gleiche Effekt bei Zellen der Bauchspeicheldrüse beobachtet (Granata et al. 2006). Anschließend entdeckte man den GRLN-R auf Zellen der SNpc und des dmNV (Zhang et al. 2004; Moon et al. 2009), zwei Areale im Hirnstamm, die im Krankheitsmodell des IPS und dem potentiell prämotorischen Stadium iRBD befallen werden (siehe Abschnitt 1.2.5 sowie 1.2.6). 1-Methyl-4-phenyl-pyridin (MPP+) kann durch Blockierung der Atmungskette den dopaminergen Zelluntergang bewirken und somit ein Tiermodell des IPS induzieren. Apoptotische oder gestresste Neurone geben Laminin, Metallperoxidasen und gegebenenfalls α -Synuklein in die Umgebung ab. Diese aktivieren umgebende Mikroglia, welche durch proinflammatorische Mediatoren weiteren Zelluntergang bewirken. Ghrelin kann diesen neurotoxischen Vorgang durch seine antioxidative Wirkung und Reduktion mikroglia-aktivierender Botenstoffe minimieren. Da GRLN-R nicht auf Mikroglia nachweisbar waren, scheint Ghrelin seine protektive Wirkung vollständig an und sekundär über Zellen der SNpc zu entfalten (Dong et al. 2008; Jiang et al. 2008; Andrews et al. 2009; Moon et al. 2009; Liu et al. 2010). Ein erhöhter BMI, Diabetes mellitus und hohes Alter gehen häufig mit erniedrigten Ghrelinspiegeln einher (siehe **Tabelle 1**). Hypothetisch wäre somit ein verminderter neuroprotektiver Schutz gegeben. Interessantweise sind ein erhöhter BMI, Diabetes mellitus und hohes Alter mit dem IPS assoziiert (Abbott et al. 2002; Hu et al. 2006). Weiterhin ist Ghrelin in der Lage, durch Bindung an den GRLN-R an Neurone der SNpc die Dopaminausschüttung im Striatum zu erhöhen (Andrews et al. 2009).

Der dorsale Vagus Komplex ist nicht vollständig von der Bluthirnschranke geschützt, somit können systemische Zytokine über eine Entzündungsreaktion die Neuronenzahl im dmNV reduzieren. Ghrelin kann im Zellexperiment den Zelltod im dmNV durch Reduktion von Interleukin 1, Interleukin 6 und Tumornekrosefaktor- α aufheben (Ammori et al. 2008). Weiterhin bewirkt es in diesem Kerngebiet die Neurogenese (Zhang et al. 2004).

Parallel zu den oben genannten neuroprotektiven Effekten von Ghrelin ist exogenes Ghrelin in der Lage, die Klinik einer experimentell autoimmunen Enzephalomyelitis, ein Tiermodell der Multiplen Sklerose, zu verbessern (Theil et al. 2009). Die Autoren gehen (im Gegensatz zu den Autoren weiter oben im Abschnitt) von einem direkten Effekt von Ghrelin auf Mikroglia aus, obwohl sie den GRLN-R nicht nachgewiesen haben.

Zusammengefasst scheint Ghrelin großes therapeutisches Potential zu besitzen. Das momentane Wissen beruht größtenteils auf Zell- und Tierexperimenten. Weitere Studien sind nötig, um die Übertragbarkeit auf den Menschen zu ermöglichen. Generell sollten jedoch immer die Nebenwirkungen bedacht werden, welche den potentiellen Einsatz limitieren könnten. Es ist vorstellbar, dass eine Verstärkung der körpereigenen Synthese gegenüber oraler oder intravenöser Applikation von synthetischem Ghrelin mit weniger Nebenwirkungen einhergeht. Eine Möglichkeit, die körpereigene Ausschüttung von Ghrelin zu steigern, könnte in der Einnahme von Rikkunshito, einer traditionellen japanischen Kräutermischung, liegen. Dieses wird erfolgreich gegen Beschwerden des oberen Magendarmtrakts angewandt. Der Wirkungsmechanismus ist nicht verstanden, aber die Effekte überschneiden sich mit den Wirkungen von Ghrelin. Folglich wurde diese Assoziation untersucht und man konnte feststellen, dass Rikkunshito die AG-Konzentration im Plasma erhöht (Matsumura et al. 2009). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Stimulation des N. vagus, welche ebenfalls die Ghrelinkonzentration im Plasma erhöht (Gil et al. 2011).

4.4 Bedeutung für zukünftige Forschungsprojekte

Der Befall des N. vagus beim IPS und der möglichen Vorstufe iRBD ist wissenschaftlich bewiesen (siehe Abschnitt 1.2.5 und 1.2.6). Weiterhin ist eine Beteiligung des N. vagus an der Ghrelinausschüttung belegt (siehe Abschnitt 1.1.2 und 4.2). Wenn man sich die Literatur betrachtet, besteht die größte Evidenz für eine Beteiligung des N. vagus an der cephalischen Phase (siehe Abschnitt 4.2). Das Maß der Aktivierung vagaler Efferenzen korreliert mit dem PP und kann somit gut kontrolliert

werden (Arosio 2004; Simonian et al. 2005; Power et al. 2008). Patienten mit Diabetes mellitus oder Vagotomie zeigen als Zeichen einer vagalen Dysfunktion in der cephalischen Phase eine signifikant reduzierte Ghrelin- und PP-Sekretion (Gaddipati et al. 2006).

Folglich könnte man ein Studiendesign auf diesen Erkenntnissen aufbauen. Es sollten alle Rahmenbedingen, also Faktoren, welche Ghrelin beeinflussen (siehe Abschnitt 4.1), durch Anamnese, Laborchemie und möglicherweise sogar zusätzliche apparative Diagnostik kontrolliert werden. Probanden sollten am Untersuchungstag nüchtern erscheinen. AG, DAG sowie PP werden als Grundwerte abgenommen. Im Anschluss daran wird die Testmahlzeit gesehen, gerochen und im Mund zerkaut, aber nicht heruntergeschluckt. Danach wird erneut AG, DAG und PP im Plasma bestimmt. Für die Blutverarbeitung sollten die in Abschnitt 4.1 erläuterten Punkte beachtet werden. Dieser Test wäre bei einem hypothetisch nachgewiesenen Unterschied weniger zeitintensiv und somit besser als Diagnostikkriterium geeignet.

5 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Faktoren, welche die Ghrelinplasmakonzentration erhöhen bzw. erniedrigen (Seite 2)

Tabelle 2: Demographische und klinische Befundübersicht des Patientenkollektivs (Seite 23)

Tabelle 3: Statistisch errechnete p-Werte (korrigiert für Alter, Geschlecht und BMI) der AUC, der AG- bzw. DAG-Nüchternkonzentrationen sowie des DAG:AG-Verhältnisses (Seite 30)

Tabelle 4: Mittelwerte, Standardabweichungen und Range der berechneten AUC, AG- und DAG-Nüchternkonzentrationen sowie DAG-AG-Verhältnis (Seite 31)

Abb. 1: Ausbreitungswege der Pathologie beim idiopathischen Parkinsonsyndrom (Seite 6)

Abb. 2: Ausbreitungswege der Pathologie beim idiopathischen Parkinsonsyndrom (Seite 7)

Abb. 3: Mittelwerte der acetylierten Ghrelinform beider IPS-Gruppen im Verlauf der Untersuchung (Seite 24)

Abb. 4: Mittelwerte der desacetylierten Ghrelinform beider IPS-Gruppen im Verlauf der Untersuchung (Seite 25)

Abb. 5: Mittelwerte der acetylierten Ghrelinform im Verlauf der Untersuchung (Seite 26)

Abb. 6: Mittelwerte der desacetylierten Ghrelinform im Verlauf der Untersuchung (Seite 26)

Abb. 7: Verhältnis der beiden Hormonformen im Verlauf der Untersuchung (Seite 27)

Abb. 8: Boxplot der kompletten Fläche unter der Kurve von acetyliertem Ghrelin (Seite 28)

Abb. 9: Boxplot der kompletten Fläche unter der Kurve von desacetyliertem Ghrelin (Seite 28)

Abb. 10: Boxplot der dynamischen Fläche unter der Kurve von acetyliertem Ghrelin (Seite 29)

Abb. 11: Boxplot der dynamischen Fläche unter der Kurve von desacetyliertem Ghrelin (Seite 29)

Abb. 12: Mittelwerte der acetylierten Ghrelinform von Frauen und Männern im Verlauf der Untersuchung (Seite 32)

Abb. 13: Mittelwerte der desacetylierten Ghrelinform von Frauen und Männern im Verlauf der Untersuchung (Seite 33)

Abb. 14: Mittelwerte der acetylierten Ghrelinform verschiedener BMI Bereiche im Verlauf der Untersuchung (Seite 34)

Abb. 15: Mittelwerte der desacetylierten Ghrelinform verschiedener BMI Bereiche im Verlauf der Untersuchung (Seite 35)

Abb. 16: Geschlechtskorrigierte Mittelwerte der acetylierten Ghrelinform im Verlauf der Untersuchung (Seite 36)

Abb. 17: Geschlechtskorrigierte Mittelwerte der desacetylierten Ghrelinform im Verlauf der Untersuchung (Seite 36)

6 Literaturverzeichnis

Abbott, R. D., G. W. Ross, L. R. White, J. S. Nelson, K. H. Masaki, C. M. Tanner, J. D. Curb, P. L. Blanchette, J. S. Popper and H. Petrovitch (2002). "Midlife adiposity and the future risk of Parkinson's disease." Neurology **59**(7): 1051-1057.

Akamizu, T. (2004). "Separate Measurement of Plasma Levels of Acylated and Desacyl Ghrelin in Healthy Subjects Using a New Direct ELISA Assay." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **90**(1): 6-9.

Ammori, J. B., W.-Z. Zhang, J.-Y. Li, B.-X. Chai and M. W. Mulholland (2008). "Effects of ghrelin on neuronal survival in cells derived from dorsal motor nucleus of the vagus." Surgery **144**(2): 159-167.

Andrews, Z. B., D. Erion, R. Beiler, Z. W. Liu, A. Abizaid, J. Zigman, J. D. Elsworth, J. M. Savitt, R. DiMarchi, M. Tschop, R. H. Roth, X. B. Gao and T. L. Horvath (2009). "Ghrelin Promotes and Protects Nigrostriatal Dopamine Function via a UCP2-Dependent Mitochondrial Mechanism." Journal of Neuroscience **29**(45): 14057-14065.

Arosio, M. (2004). "Effects of Modified Sham Feeding on Ghrelin Levels in Healthy Human Subjects." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **89**(10): 5101-5104.

Baldanzi, G. (2002). "Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT." The Journal of Cell Biology **159**(6): 1029-1037.

Banks, W. A., B. O. Burney and S. M. Robinson (2008). "Effects of triglycerides, obesity, and starvation on ghrelin transport across the blood-brain barrier." Peptides **29**(11): 2061-2065.

Beach, T. G., C. H. Adler, L. I. Sue, L. Vedders, L. Lue, C. L. White Iii, H. Akiyama, J. N. Caviness, H. A. Shill, M. N. Sabbagh and D. G. Walker (2010). "Multi-organ distribution of phosphorylated α -synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders." Acta Neuropathologica **119**(6): 689-702.

Beck, A., R. Steer and G. Brown (1996). "Manual for the Beck Depression Inventory-II." San Antonio, TX: Psychological Corporation.

Berilgen, M. S., S. Bulut, B. Ustundag, A. Tekatas and A. Ayar (2005). "Patients with multiple sclerosis have higher levels of serum ghrelin." Neuro Endocrinol Lett **26**(6): 819-822.

Blom, W. A., A. Lluch, S. Vinoy, A. Stafleu, R. van den Berg, J. J. Holst, F. J. Kok and H. F. Hendriks (2006). "Effects of gastric emptying on the postprandial ghrelin response." Am J Physiol Endocrinol Metab **290**(2): 27.

Bodkin, C. L. and C. H. Schenck (2009). "Rapid eye movement sleep behavior disorder in women: relevance to general and specialty medical practice." J Womens Health **18**(12): 1955-1963.

Braak, H., R. A. I. de Vos, J. Bohl and K. Del Tredici (2006). "Gastric α -synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology." Neuroscience Letters **396**(1): 67-72.

Braak, H. and K. Del Tredici (2010). "[Pathophysiology of sporadic Parkinson's disease]." Fortschr Neurol Psychiatr **78**(1): 1.

Braak, H., E. Ghebremedhin, H. r. Bratzke and K. Tredici (2004). "Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology." Cell and Tissue Research **318**(1): 121-134.

Braak, H., U. Rub, W. P. Gai and K. Del Tredici (2003). "Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen." J Neural Transm **110**(5): 517-536.

Braak, H., M. Sastre, J. R. E. Bohl, R. A. I. Vos and K. Del Tredici (2007). "Parkinson's disease: lesions in dorsal horn layer I, involvement of parasympathetic and sympathetic pre- and postganglionic neurons." Acta Neuropathologica **113**(4): 421-429.

Broglia, F. (2004). "Acetylcholine Regulates Ghrelin Secretion in Humans." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **89**(5): 2429-2433.

Chen, C.-Y., A. Inui, A. Asakawa, K. Fujino, I. Kato, C.-C. Chen, N. Ueno and M. Fujimiya (2005). "Des-acyl Ghrelin Acts by CRF Type 2 Receptors to Disrupt Fasted Stomach Motility in Conscious Rats." Gastroenterology **129**(1): 8-25.

Date, Y., M. Kojima, H. Hosoda, A. Sawaguchi, M. S. Mondal, T. Suganuma, S. Matsukura, K. Kangawa and M. Nakazato (2000). "Ghrelin, a Novel Growth Hormone-Releasing Acylated Peptide, Is Synthesized in a Distinct Endocrine Cell Type in the Gastrointestinal Tracts of Rats and Humans." Endocrinology **141**(11): 4255-4261.

Davenport, A. P. (2005). "International Union of Pharmacology. LVI. Ghrelin Receptor Nomenclature, Distribution, and Function." Pharmacological Reviews **57**(4): 541-546.

de la Cour, C. D., P. Norlen and R. Hakanson (2007). "Secretion of ghrelin from rat stomach ghrelin cells in response to local microinfusion of candidate messenger compounds: a microdialysis study." Regul Pept **143**(1-3): 118-126.

DGN-Leitlinie (2012). DGN / KKNMS Leitlinie zur Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. P. N. Nach: Diener HC. Stuttgart, Thieme. **Online-Version, Stand: 17.07.2012.**

Dodel, R. C., K. M. Eggert, M. S. Singer, T. E. Eichhorn, O. Pogarell and W. H. Oertel (1998). "Costs of drug treatment in Parkinson's disease." Movement Disorders **13**(2): 249-254.

Dong, J., N. Song, J. Xie and H. Jiang (2008). "Ghrelin Antagonized 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (MPP+)-Induced Apoptosis in MES23.5 Cells." Journal of Molecular Neuroscience **37**(2): 182-189.

Dunning, C. J. R., J. F. Reyes, J. A. Steiner and P. Brundin (2012). "Can Parkinson's disease pathology be propagated from one neuron to another?" Progress in Neurobiology **97**(2): 205-219.

Eggert, K., W. Oertel, H. Reichmann, G. Arnold, H. Baas, D. Berg, S. Braune, G. Deuschl, R. Dodel, T. Gasser, M. Gerlach, Höglinger, W. Jost, H. Mehdorn, M. Müngersdorf, W. Poewe, P. Reuther, J. Schulz, S. Spieker, A. Storch, K. Tatsch, C. Trenkwalder and D. Waldvogel (2012). Parkinson-Syndrome: Diagnostik und Therapie. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. C. W. Diener, C (Hrsg). 2008, Thieme Verlag. **4.Auflage**.

Erlanson-Albertsson, C. and A. Lindqvist (2008). "Vagotomy and accompanying pyloroplasty down-regulates ghrelin mRNA but does not affect ghrelin secretion." Regulatory Peptides **151**(1-3): 14-18.

Fahn, S., R. Elton and M. o. t. u. D. Committee (1987). "Recent Developments in Parkinson's Disease. Florham Park, NJ." Macmillan Health Care Information **2**: 153-163, 293-304.

Fearnley, J. M. and A. J. Lees (1991). "Ageing and parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity." Brain **114**(5): 2283-2301.

Folstein, M. F., S. E. Folstein and P. R. McHugh (1975). "'Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician." J Psychiatr Res **12**(3): 189-198.

Gaddipati, K. V., H. P. Simonian, K. M. Kresge, G. H. Boden and H. P. Parkman (2006). "Abnormal Ghrelin and Pancreatic Polypeptide Responses in Gastroparesis." Digestive Diseases and Sciences **51**(8): 1339-1346.

Gagnon, J.-F., R. B. Postuma, S. Mazza, J. Doyon and J. Montplaisir (2006). "Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder and neurodegenerative diseases." The Lancet Neurology **5**(5): 424-432.

Gagnon, J. and Y. Anini (2012). "Insulin and norepinephrine regulate ghrelin secretion from a rat primary stomach cell culture." Endocrinology **153**(8): 3646-3656.

Gil, K., A. Bugajski and P. Thor (2011). "Electrical vagus nerve stimulation decreases food consumption and weight gain in rats fed a high-fat diet." J Physiol Pharmacol **62**(6): 637-646.

Goetze, O., J. Wiczorek, T. Mueller, H. Przuntek, W. E. Schmidt and D. Woitalla (2005). "Impaired gastric emptying of a solid test meal in patients with Parkinson's disease using 13C-sodium octanoate breath test." Neuroscience Letters **375**(3): 170-173.

Gonzalez-Rey, E., A. Chorny and M. Delgado (2006). "Therapeutic Action of Ghrelin in a Mouse Model of Colitis." Gastroenterology **130**(6): 1707-1720.

Granata, R., F. Settanni, L. Biancone, L. Trovato, R. Nano, F. Bertuzzi, S. Destefanis, M. Annunziata, M. Martinetti, F. Catapano, C. Ghe, J. Isgaard, M. Papotti, E. Ghigo and G. Muccioli (2006). "Acylated and Unacylated Ghrelin Promote Proliferation and Inhibit Apoptosis of Pancreatic -Cells and Human Islets: Involvement of 3',5'-Cyclic

Adenosine Monophosphate/Protein Kinase A, Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2, and Phosphatidyl Inositol 3-Kinase/Akt Signaling." Endocrinology **148**(2): 512-529.

Hardoff, R., M. Sula, A. Tamir, A. Soil, A. Front, S. Badarna, S. Honigman and N. Giladi (2001). "Gastric emptying time and gastric motility in patients with Parkinson's disease." Movement Disorders **16**(6): 1041-1047.

Hattori, N., T. Saito, T. Yagyu, B.-H. Jiang, K. Kitagawa and C. Inagaki (2001). "GH, GH Receptor, GH Secretagogue Receptor, and Ghrelin Expression in Human T Cells, B Cells, and Neutrophils." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **86**(9): 4284-4291.

Hawkes, C. H., K. Del Tredici and H. Braak (2007). "Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis." Neuropathology and Applied Neurobiology **33**(6): 599-614.

Hoehn, M. M. and M. D. Yahr (1967). "Parkinsonism: onset, progression and mortality." Neurology **17**(5): 427-442.

Holmes, E., I. Davies, G. Lowe and L. R. Ranganath (2009). "Circulating ghrelin exists in both lipoprotein bound and free forms." Annals of Clinical Biochemistry **46**(6): 514-516.

Hu, G., P. Jousilahti, A. Nissinen, R. Antikainen, M. Kivipelto and J. Tuomilehto (2006). "Body mass index and the risk of Parkinson disease." Neurology **67**(11): 1955-1959.

ISCD-2 (2006). "ISCD-2 - International classification of sleep disorders, 2nd edition, pocket version: Diagnostic and coding manual." American Academy of Sleep Medicine, 2006.

Jiang, H., L.-J. Li, J. Wang and J.-X. Xie (2008). "Ghrelin antagonizes MPTP-induced neurotoxicity to the dopaminergic neurons in mouse substantia nigra." Experimental Neurology **212**(2): 532-537.

Johnson, K. A. and R. S. Goody (2011). "The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper." Biochemistry **50**(39): 8264-8269.

Kalbe, E., P. Calabrese, N. Kohn, R. Hilker, O. Riedel, H. U. Wittchen, R. Dodel, J. Otto, G. Ebersbach and J. Kessler (2008). "Screening for cognitive deficits in Parkinson's disease with the Parkinson neuropsychometric dementia assessment (PANDA) instrument." Parkinsonism Relat Disord **14**(2): 93-101.

Katzenschlager, R. and A. J. Lees (2004). "Olfaction and Parkinson's syndromes: its role in differential diagnosis." Current Opinion in Neurology **17**(4): 417-423.

Kojima, M., H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo and K. Kangawa (1999). "Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach." Nature **402**(6762): 656-660.

Korbonits, M. and A. Grossman (2004). "Ghrelin: update on a novel hormonal system." European Journal of Endocrinology **151**(Suppl 1): S67-S70.

Kordower, J. H., Y. Chu, R. A. Hauser, C. W. Olanow and T. B. Freeman (2008). "Transplanted dopaminergic neurons develop PD pathologic changes: A second case report." Movement Disorders **23**(16): 2303-2306.

Kosowicz, J. (2011). "Technological difficulties in ghrelin and obestatin assays." Endokrynol Pol **62**(4).

Kosowicz, J., A. Baumann-Antczak, H. Zamyslowska and J. Sowinski (2011). "Technological difficulties in ghrelin and obestatin assays." Endokrynol Pol **62**(4): 336-339.

Krenzer, M., C. Anaclet, R. Vetrivelan, N. Wang, L. Vong, B. B. Lowell, P. M. Fuller and J. Lu (2011). "Brainstem and spinal cord circuitry regulating REM sleep and muscle atonia." PLoS One **6**(10): 17.

Kumar, K., A. Djarmati-Westenberger and A. Grünewald (2012). "Genetics of Parkinson's Disease." Seminars in Neurology **31**(05): 433-440.

Lee, H. M., G. Wang, E. W. Englander, M. Kojima and G. H. Greeley, Jr. (2002). "Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations." Endocrinology **143**(1): 185-190.

LeSauter, J., N. Hoque, M. Weintraub, D. W. Pfaff and R. Silver (2009). "Stomach ghrelin-secreting cells as food-entrainable circadian clocks." Proceedings of the National Academy of Sciences **106**(32): 13582-13587.

Li, J.-Y., E. Englund, H. Widner, S. Rehnström, A. Björklund, O. Lindvall and P. Brundin (2010). "Characterization of Lewy body pathology in 12- and 16-year-old intrastriatal mesencephalic grafts surviving in a patient with Parkinson's disease." Movement Disorders **25**(8): 1091-1096.

Liu, J., C. E. Prudom, R. Nass, S. S. Pezzoli, M. C. Oliveri, M. L. Johnson, P. Veldhuis, D. A. Gordon, A. D. Howard, D. R. Witcher, H. M. Geysen, B. D. Gaylinn and M. O. Thoner (2008). "Novel Ghrelin Assays Provide Evidence for Independent Regulation of Ghrelin Acylation and Secretion in Healthy Young Men." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **93**(5): 1980-1987.

Liu, L., H. Xu, H. Jiang, J. Wang, N. Song and J. Xie (2010). "Ghrelin prevents 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced cytotoxicity through antioxidation and NF- κ B modulation in MES23.5 cells." Experimental Neurology **222**(1): 25-29.

Macleod, J. J. (1922). "Insulin and Diabetes: A General Statement of the Physiological and Therapeutic Effects of Insulin." Br Med J **2**(3227): 833-835.

Masuda, Y., T. Tanaka, N. Inomata, N. Ohnuma, S. Tanaka, Z. Itoh, H. Hosoda, M. Kojima and K. Kangawa (2000). "Ghrelin Stimulates Gastric Acid Secretion and Motility in Rats." Biochemical and Biophysical Research Communications **276**(3): 905-908.

Matsumura, T., M. Arai, Y. Yonemitsu, D. Maruoka, T. Tanaka, T. Suzuki, M. Yoshikawa, F. Imazeki and O. Yokosuka (2009). "The traditional Japanese medicine Rikkunshito increases the plasma level of ghrelin in humans and mice." Journal of Gastroenterology **45**(3): 300-307.

Miyake, S. and T. Yamamura (2009). "Ghrelin: friend or foe for neuroinflammation." Discov Med **8**(41): 64-67.

Moon, M., H. G. Kim, L. Hwang, J.-H. Seo, S. Kim, S. Hwang, S. Kim, D. Lee, H. Chung, M. S. Oh, K.-T. Lee and S. Park (2009). "Neuroprotective Effect of Ghrelin in the 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine Mouse Model of Parkinson's Disease by Blocking Microglial Activation." Neurotoxicity Research **15**(4): 332-347.

Moss, C., W. S. Dhillo, G. Frost and M. Hickson (2012). "Gastrointestinal hormones: the regulation of appetite and the anorexia of ageing." Journal of Human Nutrition and Dietetics **25**(1): 3-15.

NCC-CC (2006). "Parkinson's disease: national clinical guideline for diagnosis and management in primary and secondary care." National Collaborating Centre for Chronic Conditions **London: Royal College of Physicians, 2006.**

Overduin, J. (2004). "Role of the Duodenum and Macronutrient Type in Ghrelin Regulation." Endocrinology **146**(2): 845-850.

Pierrot-Deseilligny, C. and J. C. Souberbielle (2010). "Is hypovitaminosis D one of the environmental risk factors for multiple sclerosis?" Brain **133**(7): 1869-1888.

Pinto, S. (2004). "Rapid Rewiring of Arcuate Nucleus Feeding Circuits by Leptin." Science **304**(5667): 110-115.

Postuma, R. B., J.-F. Gagnon and J. Y. Montplaisir (2012). "REM sleep behavior disorder: From dreams to neurodegeneration." Neurobiology of Disease **46**(3): 553-558.

Power, M. L. and J. Schulkin (2008). "Anticipatory physiological regulation in feeding biology: cephalic phase responses." Appetite **50**(2-3): 194-206.

Prudom, C., J. Liu, J. Patrie, B. D. Gaylinn, K. E. Foster-Schubert, D. E. Cummings, M. O. Thorner and H. M. Geysen (2010). "Comparison of Competitive Radioimmunoassays and Two-Site Sandwich Assays for the Measurement and Interpretation of Plasma Ghrelin Levels." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **95**(5): 2351-2358.

Pruessner, J. C., C. Kirschbaum, G. Meinlschmid and D. H. Hellhammer (2003). "Two formulas for computation of the area under the curve represent measures of total hormone concentration versus time-dependent change." Psychoneuroendocrinology **28**(7): 916-931.

Rey, L. K., S. Wiczorek, D. A. Akkad, R. A. Linker, A. Chan and S. Hoffjan (2011). "Polymorphisms in genes encoding leptin, ghrelin and their receptors in German multiple sclerosis patients." Mol Cell Probes **25**(5-6): 255-259.

Sato, T., Y. Nakamura, Y. Shiimura, H. Ohgusu, K. Kangawa and M. Kojima (2011). "Structure, regulation and function of ghrelin." Journal of Biochemistry **151**(2): 119-128.

Savica, R., J. M. Carlin, B. R. Grossardt, J. H. Bower, J. E. Ahlskog, D. M. Maraganore, A. E. Bharucha and W. A. Rocca (2009). "Medical records documentation of constipation preceding Parkinson disease: A case-control study." Neurology **73**(21): 1752-1758.

Savica R, R. W. A. A. J. (2010). "When does parkinson disease start?" Archives of Neurology **67**(7): 798-801.

Schapira, A. H. V. (2009). "Neurobiology and treatment of Parkinson's disease." Trends in Pharmacological Sciences **30**(1): 41-47.

Schenck, C. H. and B. F. Boeve (2011). "The strong presence of REM sleep behavior disorder in PD: Clinical and research implications." Neurology **77**(11): 1030-1032.

Shiia, T., M. Nakazato, M. Mizuta, Y. Date, M. S. Mondal, M. Tanaka, S. Nozoe, H. Hosoda, K. Kangawa and S. Matsukura (2002). "Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion." J Clin Endocrinol Metab **87**(1): 240-244.

Simonian, h. p., k. m. kresge, g. h. boden and h. p. parkman (2005). "Differential effects of sham feeding and meal ingestion on ghrelin and pancreatic polypeptide levels: evidence for vagal efferent stimulation mediating ghrelin release1." Neurogastroenterology and Motility **17**(3): 348-354.

Stengel, A., D. Keire, M. Goebel, L. Evilevitch, B. Wiggins, Y. Tache and J. R. Reeve (2009). "The RAPID Method for Blood Processing Yields New Insight in Plasma Concentrations and Molecular Forms of Circulating Gut Peptides." Endocrinology **150**(11): 5113-5118.

Stengel, A., L. Wang and Y. Taché (2011). "Stress-related alterations of acyl and desacyl ghrelin circulating levels: Mechanisms and functional implications." Peptides **32**(11): 2208-2217.

Stiasny-Kolster, K., Y. Doerr, J. C. Moller, H. Hoffken, T. M. Behr, W. H. Oertel and G. Mayer (2005). "Combination of 'idiopathic' REM sleep behaviour disorder and olfactory dysfunction as possible indicator for alpha-synucleinopathy demonstrated by dopamine transporter FP-CIT-SPECT." Brain **128**(Pt 1): 126-137.

Stiasny-Kolster, K., G. Mayer, S. Schafer, J. C. Moller, M. Heinzel-Gutenbrunner and W. H. Oertel (2007). "The REM sleep behavior disorder screening questionnaire--a new diagnostic instrument." Mov Disord **22**(16): 2386-2393.

Theil, M. M., S. Miyake, M. Mizuno, C. Tomi, J. L. Croxford, H. Hosoda, J. Theil, S. von Horsten, H. Yokote, A. Chiba, Y. Lin, S. Oki, T. Akamizu, K. Kangawa and T. Yamamura (2009). "Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Ghrelin." The Journal of Immunology **183**(4): 2859-2866.

- Tolosa, E., C. Gaig, J. Santamaria and Y. Compta (2009). "Diagnosis and the premotor phase of Parkinson disease." Neurology **72**(Issue 7, Sul 2): S12-S20.
- Trivedi, A., S. Babic and J.-P. Chanoine (2012). "Pitfalls in the determination of human acylated ghrelin plasma concentrations using a double antibody enzyme immunometric assay." Clinical Biochemistry **45**(1-2): 178-180.
- Trojanowski, L. (1998). "Aggregation of neurofilament and α -synuclein proteins in lewy bodies: Implications for the pathogenesis of parkinson disease and lewy body dementia." Archives of Neurology **55**(2): 151-152.
- Uchiyama, M., K. Isse, K. Tanaka, N. Yokota, M. Hamamoto, S. Aida, Y. Ito, M. Yoshimura and M. Okawa (1995). "Incidental Lewy body disease in a patient with REM sleep behavior disorder." Neurology **45**(4): 709-712.
- Unger, M. M., K. Hattemer, J. C. Möller, K. Schmittinger, K. Mankel, K. Eggert, K. Strauch, J. J. Tebbe, B. Keil, W. H. Oertel, J. T. Heverhagen and S. Knake (2010). "Real-time visualization of altered gastric motility by magnetic resonance imaging in patients with Parkinson's disease." Movement Disorders **25**(5): 623-628.
- Unger, M. M., J. C. Moller, K. Mankel, K. M. Eggert, K. Bohne, M. Bodden, K. Stiasny-Kolster, P. H. Kann, G. Mayer, J. J. Tebbe and W. H. Oertel (2011). "Postprandial ghrelin response is reduced in patients with Parkinson's disease and idiopathic REM sleep behaviour disorder: a peripheral biomarker for early Parkinson's disease?" J Neurol **258**(6): 982-990.
- Williams, D. L. (2003). "Vagotomy Dissociates Short- and Long-Term Controls of Circulating Ghrelin." Endocrinology **144**(12): 5184-5187.
- Zhang, W., T. R. Lin, Y. Hu, Y. Fan, L. Zhao, E. L. Stuenkel and M. W. Mulholland (2004). "Ghrelin stimulates neurogenesis in the dorsal motor nucleus of the vagus." J Physiol **559**(Pt 3): 729-737.

7 Zusammenfassungen

Zusammenfassung

Die Sekretion des gastrointestinalen Hormons Ghrelin ist von einem intakten Nervus vagus abhängig. Die Entdeckung von pathognomonischen α -Synukleinaggregaten in Teilen des Nervus vagus in bereits frühen Stadien des idiopathischen Parkinsonsyndroms (IPS) führte zur Annahme einer potentiellen vagalen Funktionsstörung. Hypothetisch könnte sich diese Störung auf die Ghrelinsekretion bei Patienten mit IPS und der idiopathischen REM-Schlaf-Verhaltensstörung (iRBD), einer potentiellen Vorstufe des IPS, auswirken. In einer Studie zeigte sich bei diesen Patienten eine gestörte postprandiale Ghrelinausschüttung. Allerdings konnte das dabei eingesetzte Auswertungsverfahren nicht zwischen der acetylierten bzw. desacetylierten Unterform von Ghrelin (AG und DAG) differenzieren. Eine separate Messung erscheint jedoch notwendig, da weitere Untersuchungen zeigten, dass sich beide Hormonunterformen in ihrer Wirkung deutlich unterscheiden. Um den pathophysiologischen Kontext der gestörten Ghrelinsekretion differenzierter erfassen und bewerten zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit die prä- und postprandiale Sekretion beider Hormonformen analysiert. Zusätzlich wurden Patienten mit Multipler Sklerose eingeschlossen, welche ebenfalls eine veränderte Ghrelinsekretion aufweisen.

Im Rahmen der Untersuchung wurden fünf Probandengruppen gebildet: Patienten mit IPS unter (n=25) und bislang ohne (n=15) Therapie, Patienten mit iRBD (n=15), Patienten mit Multipler Sklerose (n=16) sowie gesunde Kontrollpersonen (n=25). Mit Hilfe eines „enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA) wurde die Plasmakonzentration von AG und DAG vor und nach einer Testmahlzeit an acht definierten Zeitpunkten bestimmt. Als Zielgrößen wurden die „area under the curve“, die Nüchternkonzentrationen der Hormonunterformen sowie das DAG:AG-Verhältnis definiert.

Alle Erkrankungsbilder zeigten gegenüber der Kontrollgruppe zu allen Messzeitpunkten rein deskriptiv niedrigere AG- und DAG-Konzentrationen, wobei durch eine hohe interindividuelle Variabilität kein Auswertungsparameter im Gruppenvergleich ein signifikantes Niveau erreichte.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen zwei mögliche Erklärungen zu: Entweder besteht bei den erwähnten Erkrankungen tatsächlich keine gestörte Ghrelinsekretion oder die fehlende Nachweisbarkeit beruht auf einer unzureichenden Kontrolle möglicher Faktoren, welche die zu messenden AG- und DAG-Konzentrationen beeinflussen und somit für die hohe interindividuelle Variabilität verantwortlich sein könnten. Neben einer verbesserten Präanalytik und angepasstem Untersuchungsdesign, sollten vor allem die Komorbiditäten der Probanden gezielter objektiviert werden. Erst auf dieser Basis können die vermuteten

Kausalitäten zwischen Erkrankung und Ghrelinsekretion im Rahmen von zukünftigen Projekten verifiziert werden.

Abstract

The secretion of the gastrointestinal hormone ghrelin is dependent on an intact vagal nerve. The discovery of pathognomonic α -synuclein aggregation in parts of the vagal nerve in earlier stages of Parkinson's disease (PD) has led to the assumption of a potential vagal function disorder. Hypothetically this dysfunction could affect the ghrelin secretion of patients with PD and idiopathic REM-sleep behavior disorder (iRBD), a potential preclinical stage of PD. A recent study revealed an impaired postprandial ghrelin secretion in these patients. However, analysis techniques used in these studies could not distinguish between acylated and desacylated ghrelin subtypes (AG and DAG). Further investigations revealed distinct differences in their physiological effects, strongly indicating that separate measurement is required. In order to exactly determine the pathophysiological context of disturbed ghrelin secretion, the current study analyzed pre- and postprandial concentrations of AG and DAG. Additionally, patients with multiple sclerosis who also showed a change in ghrelin secretion were included.

Consequently, the design of the investigation included five groups: PD patients with (n=25) and without (n=15) treatment, patients with iRBD (n=15), patients with multiple sclerosis (n=16) and healthy controls (n=25). AG and DAG were determined at eight selected points of time using a commercial "enzyme linked immunosorbent assay" (ELISA). The area under the curve, fasting concentrations of the respective hormones and the DAG:AG ratio were defined as outcome parameters.

For each group of patients, we demonstrated a reduction of both AG and DAG concentrations at every measuring point. However, none of these outcome parameters reached a significant level due to a high inter-individual variability.

The present results can be interpreted in two ways. Either there is no altered ghrelin secretion in the above mentioned diseases or the missing detectability is a result of an insufficient control of factors affecting AG and DAG concentrations and thus may be responsible for the high inter-individual variability. In this context, an improved preanalytic phase, a more adapted research design and objectively measured comorbidities should be considered in further research on the topic.

8 Anhang

8.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen/Herren:

Aigner, Aumüller, Barth, Basler, Bauer, Baum, Behr, Berger, Bien, Cetin, Czubayko, Daut, Dietrich, Engenhard-Cabillic, Feuser, Fuchs – Winkelmann, Görg, Grzeschik, Gress, Grundmann, Hamer, Hertl, Hofmann, Hoyer, Klose, Koehler, Koolman, Lill, Löffler, Lohoff, Maisch, Moll, Mueller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oertel, Pagenstecher, Plant, Preisig-Müller, Rausch, Renz, Richter, Röhm, Rosenow, Ruchholtz, Schäfer, Schade, Schneider, Schulze, Seitz, Steiniger, Voigt, Vogelmaier, Weihe, Werner

8.2 Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die mich während der Umsetzung meiner Doktorarbeit betreut, unterstützt und motiviert haben.

Als erstes sei an dieser Stelle Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wolfgang H. Oertel zu nennen, der durch seine thematische Einführung mein Interesse an der Neurologie geweckt hat und für die Rahmenbedingungen verantwortlich ist, unter denen ich diese Arbeit durchführen konnte.

Weiterhin danke ich Dr. Marcus Unger für die zuverlässige Betreuung während der Arbeit. Vom Ethikantrag bis zur Durchsicht des Manuskripts war er stets eine große Hilfe.

Ebenso möchte ich in diesem Kontext PD Dr. med. Vincent Ries erwähnen, der mir in der Endphase des Projektes zur Seite stand.

Für die Unterstützung während der Patientenrekrutierung gilt mein Dank Sabine Lazer und Isabel Manthe. Ich danke Christine Höft für die großartige Hilfe im Labor.

Schließlich möchte ich mich bei allen Probanden bedanken. Ohne deren Zuverlässigkeit und Engagement hätte die Studie nicht durchgeführt werden können.

Letztlich möchte ich noch meinen Eltern, meinen Geschwistern und Freunden danken, die mir die ganze Zeit über unterstützend beiseite standen.